ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON
ANNÉE 1974 N° 35

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CONTROLES DE SUBSTANCES PYROGÈNES

— **Test pyrogène chez le rat.**

— **Proposition d'une méthode d'interprétation statistique.**

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 1er Juillet 1974

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Ghislaine BÉRANGER-GÉRARD

née le 11 Mai 1948

à LYON

ASSOCIATION CORPORATIVE
DES ÉTUDIANTS EN MÉDECINE DE LYON
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
8, Avenue Rockefeller, 8
69373 LYON Cedex 2

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544713_0037

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

ANNÉE 1974 N°

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CONTROLES DE SUBSTANCES PYROGÈNES

— **Test pyrogène chez le rat.**

— **Proposition d'une méthode d'interprétation statistique.**

THÈSE

présentée

à l'UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD de LYON

(Médecine-Pharmacie)

et soutenue publiquement le 1er Juillet 1974

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Ghislaine BÉRANGER-GÉRARD

née le 11 Mai 19 8

à LYON

ASSOCIATION CORPORATIVE
DES ÉTUDIANTS EN MÉDECINE DE LYON
UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD
8, Avenue Rockefeller, 8
69373 LYON Cedex 2

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL ENSEIGNANT

DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

- Directeur ..... M. le Professeur J. FROGET
- Directeurs Honoraires ..... MM. les Professeurs JUNG, TAPERNOUX, FLORIO

PROFESSEURS

15 Chaires

1° - Pharmacie et Toxicologie	M. LORGUE
2° - Anatomie descriptive, Extérieur, Anatomie appliquée	M. BARONE
3° - Physiologie, Thérapeutique, Pharmacodynamie	M. BOST
4° - Histologie, Embryologie, Anatomie pathologique	M. LUCAM
5° - Hygiène et Industrie des Aliments d'origine animale	M. FLACHAT
6° - Zoologie appliquée, Parasitologie externe, Parasitologie interne	M. EUZEBY
7° - Pathologie médicale des équidés et des carnivores, législation vétérinaire.	M. FONTAINE
8° - Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	M. COTTEREAU
9° - Technique chirurgicale, Pathologie chirurgicale	M. COULON
10° - Obstétrique, Pathologie de la Reproduction	M. BERTRAND
11° - Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie	M. OUDAR
12° - Ethnologie, Zootechnie, Economie rurale	M. FROGET
13° - Botanique appliquée, Agronomie, Alimentation	M. WOLTER
14° - Physique et Chimie biologiques et médicales	M. MAGAT
15° - Maladies contagieuses, Zoonoses, Législation sanitaire	M. JOUBERT

======

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. BUSSIERAS, FERNEY (Détachés à l'Institut de Médecine et Sciences Vétérinaires de DAKAR)
MM. CHANTEGRELET, JEAN-BLAIN, LAPRAS.

MAITRES-ASSISTANTS AGREGES

MM. BOIVIN, DELATOUR, DESCHANEL, LE NIHOUANNEN, MOUTHON.

MAITRES-ASSISTANTS

Mme CHAUVE, MM. DALBIEZ, GASTELLU, Mle LAVAL, MM. PRAVE, RICHARD, FARGES.

ASSISTANTS

MM. AFFRE, BASTIEN Gilles, Mme BASTIEN Jacqueline, M. BAUDRY, Mle BERNARD, MM. BRAYE, COURAGE, Mle DOMENEC, MM. GROSMOND, KECK, LACHAL, LIEVRE.

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : Monsieur le Professeur BERTOYE, de la Faculté de Médecine.
Premier Assesseur : Monsieur le Professeur OUDAR, de l'Ecole Nationale Vétérinaire.
Deuxième Assesseur : Monsieur le Professeur MAGAT, de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

L'Université Claude Bernard de LYON (Médecine-Pharmacie), et l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON, déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A PATRICK

A MES PARENTS

A MA SOEUR VERONIQUE

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

Qu'ils trouvent ici un modeste témoignage de ma reconnaissance et de mon affection.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur BERTOYE

Il nous a fait l'honneur de présider le Jury de notre thèse.

Monsieur le Professeur OUDAR

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Nous le remercions de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance pour la bienveillance avec laquelle il nous a guidée tout au long de sa réalisation.

Monsieur le Professeur MAGAT

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

Ses conseils et son aide dans le domaine des statistiques nous furent précieux. Nous sommes heureuse de pouvoir lui exprimer nos remerciements d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre Jury.

A NOS MAITRES ,

et tous ceux qui ont contribué à notre formation.

Nous tenons à remercier:

L'Institut MERIEUX qui nous a gracieusement fourni les endotoxines nécessaires à notre expérimentation,

et particulièrement :

Monsieur ROUMIANTZEFF

Monsieur BERANGER

Monsieur STELLMANN.

Nous avons particulièrement apprécié la confiance qu'ils nous ont toujours témoignée.

Leur attitude amicale et réconfortante, et leurs conseils bienveillants furent notre meilleur encouragement.

Nous remercions également:

Le personnel du Service de pathologie générale de l'Ecole Vétérinaire, qui nous a toujours prêté l'aide nécessaire à la réalisation matérielle de nos expériences.

P L A N

INTRODUCTION

1ère PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I - LES PYROGENES

A - CONNAISSANCES ACTUELLES

a) Pyrogènes exogènes

b) Pyrogènes endogènes.

B - CARACTERISTIQUES D'ACTION DES PYROGENES - APPLICATIONS PRATIQUES

a) Intensité

b) Sensibilité comparée de diverses espèces animales

c) Rapport entre activité pyrogénique et toxicité aiguë

d) Courbes d'hyperthermie

e) Phénomène de tolérance

f) Conclusions.

C - INTERET EN PHARMACOLOGIE

II - LE TEST PYROGENE

A - INTRODUCTION

B - HISTORIQUE

C - PRINCIPES ET METHODES

D - COMPARAISON DES PROTOCOLES DE L'ESSAI DES SUBSTANCES PYROGENES A TRAVERS DIFFERENTES PHARMACOPEES

a) Application de l'essai

b) Choix de l'animal

c) Matériel

d) Conditions de réalisation du test

e) Température témoin

f) Essai proprement dit

g) Interprétation.

E - INCONVENIENTS DE LA METHODE

a) Le choix de l'espèce animale

1 - Variations d'un individu à l'autre
2 - Variations individuelles
3 - Sensibilité comparée du lapin et de l'homme
4 - Conclusions.

b) Les difficultés d'interprétation

1 - Signification de l'élévation thermique
2 - Manque d'unité entre les pharmacopées
3 - Prise en considération de l'hypothermie
4 - Nombre de variables : - facteur temps
- facteur dose
5 - Conclusions.

2ème PARTIE EXPERIMENTALE

I - PROPOSITION D'UNE NOUVELLE METHODE STATISTIQUE POUR L'INTERPRETATION DU TEST PYROGENE

A - PRINCIPE GENERAL DE CALCUL

B - APPLICATION AU TEST PYROGENE SUR LAPIN

C - DOSE STIMULANTE LIMITE

D - CONCLUSIONS.

II - LE TEST PYROGENE CHEZ LE RAT

A - LE RAT

Rappel des travaux antérieurs

Raisons ayant motivé son choix.

B - EXPERIMENTATION

1° - Variations thermiques de la population normale de rats

2° - Variations thermiques dues aux manipulations

3° - Contrôle de l'effet pyrogène de différents produits sur rats.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE.

I N T R O D U C T I O N

Tous ceux qui pratiquent les "essais des substances pyrogènes" connaissent un certain nombre de difficultés, dues au fait que le protocole proposé par les pharmacopées est peu conciliable avec les exigences économiques de l'industrie pharmaceutique moderne.

Dans ce travail:

- nous ferons le point sur l'essentiel des connaissances actuelles concernant les pyrogènes,

- nous rappelerons le "test pyrogène", tel qu'il est officiellement décrit par les différentes pharmacopées,et mettrons en lumière à travers elles un certain nombre d'inconvénients tenant, d'une part à l'animal utilisé (le lapin), et d'autre part aux difficultés d'interprétation;

- puis, dans le but d'apporter quelques solutions à ces difficultés d'interprétation, nous proposerons:

  . d'utiliser le rat, matériel économique et homogène, en conservant le protocole classique du Codex,

  . pour la lecture de nos résultats, d'appliquer une méthode statistique d'interprétation intitulée "test des surfaces".

- oOo -

I - LES PYROGENES

A - CONNAISSANCES ACTUELLES

Avant d'exposer les principes et méthodes du test pyrogène tel qu'il est officiellement décrit dans les différentes pharmacopées, il nous semble indiqué ici de donner un aperçu sur l'état actuel des connaissances sur les pyrogènes.

On entend par "pyrogènes" des substances organiques formées par des micro-organismes et qui, administrées par voie parentérale en quantités minimes, provoquent la fièvre chez l'homme et les animaux pendant une durée d'action variable mais déterminée (87).

Aujourd'hui, bien que de nombreuses obscurités subsistent sur la physiologie du syndrome fièvre, le facteur déterminant de l'élévation thermique a pu être situé, soit dans l'agent infectieux lui-même (pyrogènes exogènes), soit dans les cellules de l'hôte à la suite d'une infection par ce même agent (pyrogènes endogènes).

a) Pyrogènes exogènes

Les bactéries en constituent de très loin la source principale - parmi les pyrogènes bactériens (90, 91), les mieux connus chimiquement sont ceux des bactéries GRAM négatif-, et ils se confondent avec les endotoxines de ces microorganismes. Localisés essentiellement dans les couches externes de la paroi bactérienne, ce sont des complexes renfermant une protéine, un phospholipide et un liposaccharide (L.P.S.).

L'activité pyrogénique et les propriétés immunologiques de l'endotoxine sont liées au L.P.S. polymère de haut poids moléculaire (400.000 à 1 million), dont la composition varie selon les bactéries, et dont la partie lipidique, dite "Lipid A", est le support spécifique de l'activité endogénique.

On peut également obtenir une fièvre expérimentale, l'hyperthermie étant alors plus modérée par injection intra-veineuse:

- de bactéries GRAM + vivantes ou tuées par la chaleur, ou de leurs exotoxines (4);
- de virus (1, 4) ;

- de champignons et de levures (67);

- de tuberculine après sensibilisation de l'individu par le B.C.G. (43 - 51 - 65) et, d'une manière générale, de protéines hétérologues provoquant dans l'organisme, après sensibilisation, une réaction AG - AC (66 - 72);

- de stéroïdes (15 - 16);

- de divers produits comme le Dextrane Hydrolyse (69) ou des émulsions lipidiques. Dans tous les cas, la substance responsable de la pyrogénicité est de nature lipopolysauhride, et on lui reconnaît toujours les mêmes propriétés:

  Thermostable, elle n'agit qu'après une période de latence longue par rapport à celle des autres pyrogènes que nous allons définir. Elle provoque une leucopénie initiale habituellement marquée; et enfin, elle possède la caractéristique fondamentale d'induire un état de tolérance après des injections répétées.

b) Pyrogènes endogènes

Ils sont produits dans l'organisme lui-même. Ils apparaissent dans le sang de l'hôte infecté, alors que les pyrogènes exogènes diminuent. Il semble maintenant acquis que le pyrogène endogène représente la voie finale et le signal afférent au système nerveux central commun aux fièvres (71). WOOD et ATKINS l'ont d'ailleurs obtenu pour la première fois à partir de sang de lapin, après injection de pyrogènes microbiens (6 - 7); plus récemment les fièvres d'hypersensibilité furent étudiées avec des agents non microbiens, tels que les protéines hétérologues, sérum albumines humaines ou bovines: après injection intra-veineuse aux lapins. Dans les expériences, 2 pyrogènes furent identifiés: complexes AQ - AC solubles qui apparaissent dans la circulation immédiatement après l'injection, et un deuxième agent qui apparut plus tard, ayant les propriétés du pyrogène endogène.

Les endopyrogènes furent détectés d'abord au niveau du foyer d'infection et, plus tard, à la fois dans la lymphe du canal thoracique, puis dans le sang, lors de la fièvre. De plus, alors que l'infection était contrôlée par pénicilline et que la fièvre subsistait, les pyrogènes n'étaient plus présents dans aucun des sites.

Les observations prouvent de toute évidence qu'un endo-pyrogène circulant peut être mis en cause par une variété de stimulis, microbiens ou non, et que les endo-pyrogènes apparaissent dans le sang alors que la fièvre se développe, et sans doute représentent le chemin habituel qui mène à la fièvre.

Ceci explique la période de latence lors de l'accès fébrile consécutif à l'injection intra-veineuse d'endotoxine,et la leucopénie précoce accompagnant cette période de latence reflète le rôle des leucocytes dans son élaboration (6 - 7).

Contrairement au pyrogène bactérien, il est thermostable et ne provoque pas de phénomènes de tolérance après des injections successives répétées (84). Lors de l'injection intra-veineuse, l'hyperthermie se déclare après une période de latence courte.

B - CARACTERISTIQUES D'ACTION DES PYROGENES - APPLICATIONS PRATIQUES

Etant donnée leur grande activité, les pyrogènes les plus utilisés pour l'expérimentation sont les endotoxines des bactéries, et nous ne nous occuperons ici que des seuls pyrogènes bactériens.

a) Intensité (58 - 17 - 53 - 57)

Les pyrogènes bactériens représentent sans doute les substances pharmacologiquement les plus actives que l'on connaisse. Les L.P.S. de certains bacilles GRAM négatifs obtenus actuellement dans un état de grande pureté, agissent à des doses extraordinairement faibles. Leurs doses pyrogéniques minimales qui, injectées par voie veineuse chez le lapin entraînent une élévation significative de la température rectale, se situent en effet à des fractions infimes de microgrammes (0,0004 à 0,002). Aucun hyperthermisant n'atteint une telle activité, puisque le plus puissant connu, qui est le lysergamide (L.S.D. 25), n'agit chez le lapin qu'à la dose minimale de 0,5 microgramme/kg I.V.

Dans la pratique, les expérimentateurs utilisent, soit des vaccins renfermant des germes tués (vaccin antityphoïdique, vaccin antigonococcique), soit des lipopolysaccharides purifiés d'E. Coli, d'E. Typosa, de Salmonella abortus equi (Pyrexal), de pseudomonas (Pyromen) par exemple. La mise au point d'une préparation internationale de référence de pyrogène est à l'étude depuis plusieurs années. A la suite de recommandation s du Comité O.M.S. d'experts de la standardisation biologique, le choix s'est porté sur l'antigène O de SHIGELLA DYSENTERIAE - type 1 de KAUFFMAN - lors d'essais dans le laboratoire où la substance a été préparée, environ 0,003 microgramme suffisent pour élever la température des lapins (18).

b) Sensibilité comparée de diverses espèces animales (58 - 68)

Par ordre décroissant de sensibilité aux pyrogènes bactériens, on trouve le cheval, l'homme, le lapin, le singe, le chien, le chat, le cobaye, le rat, la souris, le hamster, la poule et le pigeon.

Dans la pratique, le lapin est le plus souvent utilisé par les expérimentateurs, car sa zone de neutralité thermique s'étend entre 18° et 25°, température ambiante facilement réalisable. Les contrôles d'apyrogénicité des solutés injectables sont faits sur lapin. De là, l'intérêt de connaître la sensibilité comparée de l'homme et du lapin aux endotoxines bactériennes, cela permet d'extrapoler les réponses fébriles du lapin à celles de l'homme.

c) Rapports entre activité pyrogénique et toxicité aiguë

Pour certains pyrogènes bactériens, on dispose d'informations précises concernant leur toxicité aiguë. Malheureusement, celle-ci est établie le plus souvent chez la souris et le chien, alors que l'effet hyperthermisant est en général mesuré chez le lapin.

EICHENBERGER (34) admet que la dose pyrogénique minimale équivaut au millionième de la dose léthale chez le même animal (lapin) et par la même voie (intraveineuse).

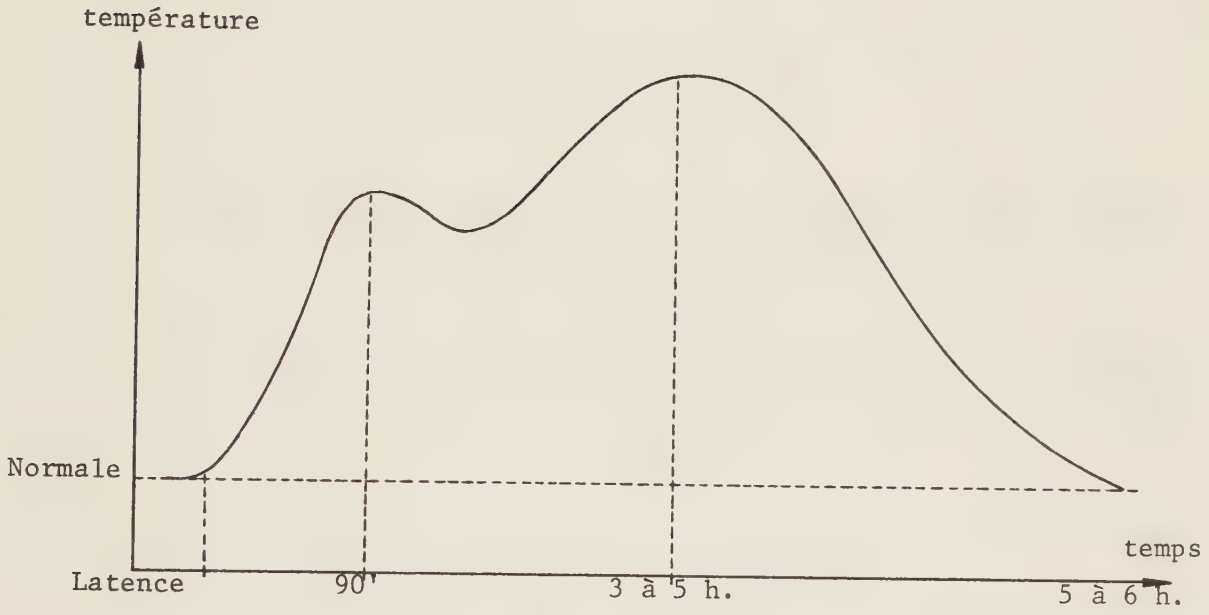
d) Courbes d'hyperthermie

Parmi les propriétés physiologiques des pyrogènes, celle qui a été la plus étudiée est évidemment celle de provoquer de l'hyperthermie.

Chez l'homme, cette hyperthermie se manifeste une heure environ après l'injection de soluté, et l'effet se prolonge de 4 à 12 heures. Les animaux accusent une hyperthermie analogue et, dans les mêmes délais, le maximum atteint est plus élevé que chez l'homme, tout au moins chez le chien et le lapin, puisque la température normale de ces animaux oscille autour de 39°.

Si l'on enregistre la température interne des sujets en expérience, soit d'une manière continue, soit à intervalles assez rapprochés (de 30 en 30 minutes par exemple), on constate que les courbes établies ne présentent pas toujours le même aspect.

GRAPHIQUE N°1



D'après (30)

WYLLIE et TOOD ont décrit trois types de courbes (90) :

- la plus fréquente, caractérisée par un maximum précoce (90 minutes en général), suivi d'un rapide retour à la normale,

- la plus rare, marquée par une élévation thermique beaucoup plus lente de la température, avec un maximum seulement au bout de 3 à 4 heures,

- enfin, la courbe en double clocher, combinaison des deux précédentes.

Aujourd'hui, on considère que la courbe la plus typique est une courbe biphasique (65) , (cf. Tableau).

Cette courbe est caractérisée par:

- un temps de latence,

- une ascension thermique pendant laquelle l'organisme diminue sa thermolyse et augmente sa thermogénèse (vaso-constriction -frissons...),

- un maximum avec 1 ou 2 clochers thermiques,

- une défervescence pendant laquelle l'organisme diminue sa thermogénèse et augmente sa thermolyse (sudation - polypnée - vaso-dilatation périphérique).

e) Phénomène de tolérance

Une des caractéristiques des fièvres expérimentales mettant en jeu un pyrogène d'origine endogène, est le développement d'une diminution de la réponse fébrile, habituellement appelée "Tolérance" (9).

f) Conclusions

De ces considérations générales sur les propriétés essentielles des pyrogènes, nous retiendrons:

1. que les pyrogènes les plus utilisés pour l'expérimentation sont les endotoxines des bactéries GRAM négatives;

2. que la stérilisation des produits finaux par la chaleur suivant les recommandations de la pharmacopée ne peut détruire tous les contaminants pyrogènes par suite de leur thermostabilité élevée. On pourra ainsi les révéler dans tous les milieux où des microorganismes se

sont développés, même si une stérilisation convenable a détruit ces derniers;

3. que du fait de l'existence d'un relais sanguin ou pyrogène endogène, seules les injections parentérales sont susceptibles de produire de la fièvre, à la différence d'autres préparations stériles telles que collyres, pommades oculaires, qui ne sont pas introduites dans l'appareil circulatoire, et ainsi ne produisent pas d'effets pyrogènes.

Nous avons à présent tous les éléments permettant de comprendre l'utilité et la technique du test pyrogène appliqué aux solutés injectables.

C - INTERET EN PHARMACOLOGIE

Une des conditions préalables les plus importantes pour l'emploi thérapeutique sans complications à craindre des produits pharmaceutiques à administrer par voie parentérale, est l'absence de substances donnant de la fièvre. Tous les produits actifs et accessoires, ainsi que les liquides servant à la confection des préparations injectables, doivent subir des tests de pyrogénicité. De même, doivent être soumis à ce test les seringues en plastique à usage unique et les matériels pour transfusions de sang ou succédanés du sang (norme DIN 58360, annex I, BEUTE-Vertrieb GmbH, BERLIN et COLOGNE).

L'essai de PYROGENICITE prend donc une importance toute particulière dans le cadre des systèmes de contrôle biologique. Pour cette raison, il figure notamment parmi les conditions édictées par les pharmacopées.

Juger une préparation pharmaceutique avant son utilisation ou sa commercialisation est une décision entraînant des conséquences graves, puisque l'utilisation d'une préparation non conforme est interdite, et sa transformation en une substance apyrogène est une opération très onéreuse, voire parfois même impossible.

Les pyrogènes ont une autre application en pharmacologie, et dont les débouchés ne sont pas négligeables: le contrôle d'activité et l'étalonnage des médicaments antipyrétiques sont effectués sur des animaux ayant subi au préalable une injection qui élève leur température centrale. L'obtention d'une hyperthermie durable, stable et reproductible, facilite ces contrôles, d'où l'intérêt d'une connaissance meilleure des substances pyrogènes et de leurs effets chez différents animaux.

II - LE TEST PYROGENE

A - INTRODUCTION

La notion de présence dans l'eau et les solutés injectables stériles de substances pyogènes n'a été acquise qu'après de nombreux tâtonnements.

On a pendant longtemps incriminé le médicament lui-même ou le solvant, et parlé par exemple de fièvre au chlorure de Sodium, de fièvre de l'eau. Si, en 1876, BURDON SANDERSON utilisait pour la première fois le substantif anglais "Pyrogens" pour désigner toutes les substances capables d'élever la température interne, de nombreux mystères entouraient encore le mécanisme de la fièvre. Les recherches auxquelles ont donné lieu les substances ont contribué à une meilleure connaissance des mécanismes de la fièvre. Les travaux entrepris dans ce sens, à partir de 1923, par SERBERT, et poursuivis ensuite aux Etats-Unis et en Europe, ont définitivement imposé la nécessité de soumettre les produits industriels à usage thérapeutique à un test officiel: le test pyrogène.

Il importe de savoir si ce test, tel qu'il est actuellement proposé, apporte dans sa méthode et dans son interprétation une sécurité suffisante.

B - HISTORIQUE

La fièvre est sans doute une des manifestations la mieux connue de la maladie. Dans la plupart des écrits historiques, les mots fièvres, infection, inflammation sont toujours plus ou moins associés et souvent confondus, quant à leur origine. La mesure de la température centrale, chez l'homme normal ou malade, est cependant entrée en pratique dès 1871, alors que WUNDERLICH publiait son manuel de thermomètre médical.

Les mauvais effets suivant les traitements par injection (sans rapport avec l'agent thérapeutique) furent étudiés dès l'introduction de la seringue hypodermique, en 1855; et, en 1865, BILLROTH (14) signale les réactions fébriles qui affectaient certains malades soumis à des injections parentérales. Il en rechercha l'origine dans les produits injectés, ainsi que dans les solvants utilisés, pouvant contenir des substances étrangères hyperthermisantes.

C'est en 1876 que BURDON SANDERSON (19) propose la dénomination "Pyrogènes" pour désigner une substance isolée de la viande, capable de provoquer la fièvre.

En 1911, HORT et PENFOLD (49) signalent que l'eau physiologique injectée en intraveineuse à l'homme ou à l'animal peut provoquer une poussée fébrile. Plus tard, ils reconnaissent que ces injections peuvent être faites sans inconvénient si certaines précautions sont prises concernant l'eau distillée employée, celle-ci devant être recueillie et gardée dans des conditions de propreté chirurgicale.

Depuis, de nombreux travaux éclaircissent les mécanismes de la fièvre et les propriétés des agents pyrogènes, essentiellement leur origine bactérienne: bactéries mortes, intactes ou désintégrées, pathogènes ou non, soit, plus généralement, des produits du métabolisme bactérien (SEIBERT et ses collaborateurs). SEIBERT (74) suggéra également le premier d'utiliser le lapin pour vérifier les propriétés apyrogènes d'une solution.

Plus récemment, CO-TUI et SCHRIFT (25) ont fait une étude systématique des différentes espèces bactériennes génératrices de pyrogènes: sur le lapin et le chien.

Enfin, les travaux de WECHSELMANN (85), JONA (52), RADEMAKER, BANKS (8), CO-TUI (24), aboutirent, en 1942, à l'adoption par loi pharmacopée américaine (12ème édition) d'un "essai des substances pyrogènes", basé sur la mesure de l'élévation de la température rectale du lapin.

- La pharmacopée britannique devait l'imiter peu après.

- En France, GERMAN, DORCHE, CHARONNAT (37 - 32 - 20 - 21) et leurs collaborateurs apportent les résultats de 70 tests pratiqués suivant un protocole semblable à celui adopté par la pharmacopée américaine, et dont la Commission du Codex a bien voulu s'inspirer pour la rédaction de l'arrêté du 31 mars 1949 (Journal Officiel du 12 avril 1949) apportant au Codex Médicamentarius Gallicus, édition 1937, la modification suivante:

  "Addition d'un article au tome II p. 597, se rapportant aux produits injectables, ajouter: Recherche des substances pyrogènes - méthode identique à celle de la pharmacopée américaine, tous les solutés injectables présentés en ampoules ou flacons d'une capacité supérieure à 125 cm3 devront satisfaire à cet essai, ainsi que tous les solutés portant l'indication apyrogènes".

Le test pyrogène avait fait ses premiers pas dans le domaine de la pharmacologie.

C - PRINCIPES ET METHODES

Parmi les nombreux tests proposés, basés soit sur le compte bactérien (63), soit sur l'absorption dans l'ultra-violet ou la conductibilité électrique, aucun ne fut jugé suffisamment spécifique; seules ont été retenues les méthodes biologiques.

La mise au point de tests in vitro est actuellement à l'étude (22). On met à profit, par exemple, la propriété des endotoxines bactériennes pyrogènes de provoquer la gélification immédiate d'un lysat préparé à partir d'amibocytes de crabe: le Limulus polyphemus. C'est le "Limulus test" proposé par LEVIN et BANG (61 - 62) dès 1956. C'est un test rapide, sensible et reproductible, qui apportera peut-être, dans un proche avenir, la solution à bien des problèmes.

Aujourd'hui, pour la recherche de ces substances, on se sontente de mettre à profit leur propriété de provoquer de la fièvre en injectant la substance à essayer sur des animaux de laboratoire, dont on contrôle ensuite la température corporelle pendant un certain temps.

Pour les essais, toutes les pharmacopées utilisent le lapin; l'injection intra-veineuse du soluté, s'il contient des pyrogènes, se manifeste par une réaction fébrile. Le soluté est alors caractérisé par l'accroissement maximum ou la moyenne des accroissements de température provoqué par l'injection intra-veineuse du soluté par rapport à la température témoin prise avant l'injection. Certaines limites maxima sont fixées à ces accroissements au-delà desquels le soluté ne pourra être considéré comme "apyrogène".

D - COMPARAISON DES PROTOCOLES DE L'ESSAI DES SUBSTANCES PYROGENES A TRAVERS DIFFERENTES PHARMACOPEES

1 - Application de l'essai

- La Pharmacopée américaine indique que le test est à pratiquer sur les produits dont la monographie l'exige.
- La Pharmacopée française seule ajoute à cela que le test est applicable aux solutés injectables dont le volume est supérieur à 125 ml, ou à ceux indiqués "apyrogènes".

2 - Choix de l'animal

a) Sexe

- Les Pharmacopées belge et française précisent que les lapins peuvent être indifféremment mâle ou femelle.

- La Pharmacopée américaine note seulement qu'il s'agit de lapins adultes.

b) Poids

- Quatre Pharmacopées imposent des lapins de poids supérieur à une limite qui est de 1,500 kg pour les Pharmacopées française et britannique, 1,700 kg pour les Pharmacopées internationale et américaine.

- Les Pharmacopées belge, allemande, italienne et japonaise précisent un poids supérieur limite qui, suivant les textes, varie de 2 à 3,500 kg.

c) Régime de l'animal

Il est dit que l'animal doit être soumis à un régime complet, sans qu'il y ait perte de poids, ceci dans toutes les Pharmacopées, à l'exception de la Pharmacopée allemande.

d) Prise de température avant l'essai

Les différentes pharmacopées stipulent que la température du lapin doit être contrôlée dans les jours qui précèdent l'essai:

- tous les deux jours;

- un à trois jours avant (Pharmacopées internationale, américaine, britannique, japonaise);

- trois jours avant (Pharmacopées allemande et italienne).

Le nombre de prises de température, de même que l'intervalle entre les prises, sont définis dans chaque pharmacopée. Les conclusions sont les suivantes:

Les Pharmacopées internationale, française et italienne, retiennent qu'il faut utiliser des lapins dont la température est comprise entre 38° 0° C et 39,8° C.

Selon la Pharmacopée belge, l'écart ne doit pas dépasser 0,5 ° C d'un jour à l'autre.

D'après la Pharmacopée américaine, les oscillations thermiques des lapins ne doivent pas être supérieures à 0,1 ° C, et la température de ces lapins ne doit pas dépasser 39,8° C.

La Pharmacopée française exclut les lapins accusant une variation de température dépassant 0°2 C entre deux lectures successives dans la détermination de la température initiale.

e) Injection d'un standard pyrogène

- Les Pharmacopées internationale, américaine et japonaise, ne demandent pas de vérifier préalablement si les lapins répondent bien à un standard pyrogène.

- Les Pharmacopées française, belge, italienne, imposent l'injection d'un standard pyrogène, sans fournir de précisions concernant ce standard pyrogène, si ce n'est la Pharmacopée italienne qui demande de le préparer à partir de Shigella dysenteriae.

- Les Pharmacopées allemande et française prescrivent d'injecter du soluté isotonique de chlorure de Sodium apyrogène. Si la réponse du lapin est supérieure à + 0°4 C (Pharmacopée allemande) ou à + 0°6 C (Pharmacopée française) il ne faut pas utiliser l'animal.

f) Durée de repos à respecter entre deux tests

- Dans les Pharmacopées britannique et japonaise, il est dit que la période de repos doit être aussi longue que possible. Elle est de huit jours dans la Pharmacopée belge.

- Dans les Pharmacopées française, américaine et italienne, la période de repos varie suivant que le test a été positif ou négatif. Il varie de deux à trois jours si le test est négatif, de huit à quinze jours si le test est positif.

- Les prescriptions des Pharmacopées internationale et allemande diffèrent légèrement.

- Pharmacopée internationale: un jour de repos au moins pour chaque dixième de degré d'élévation.

- Pharmacopée allemande: trois jours de repos si le test est négatif; quatorze jours si l'élévation thermique a été inférieure à 1°,2 C, 21 jours si elle a été supérieure à 1°,2 C.

3 - Matériel

a) Appareil pour déterminer la température

La Pharmacopée belge demande d'utiliser seulement des thermomètres médicaux, les Pharmacopées américaine, britannique, allemande, italienne, japonaise, laissent le choix entre thermomètres et enregistreurs.

b) Profondeur d'introduction rectale du thermomètre

- Les Pharmacopées internationale et allemande sont muettes sur ce point.
- Selon les autres Pharmacopées, cette profondeur varie de 5 à 9 centimètres.

c) Matériel d'injection

- Les Pharmacopées britannique et allemande ne fournissent aucune précision à ce sujet.
- La Pharmacopée française demande que les seringues et aiguilles soient lavées et stérilisées une heure à 180° C.
- Les Pharmacopées internationale, belge, américaine, italienne et japonaise indiquent que la stérilisation doit durer trente minutes à 250° C.

d) Emploi d'un appareil de contention

- Seules signalent la possibilité de l'emploi d'un appareil de contention les Pharmacopées belge et française, cette dernière stipulant que le lapin peut être immobilisé pendant la durée du test, ou remis dans sa cage entre chaque prise de température.
- La Pharmacopée britannique note que si on utilise une sonde à demeure, la contention doit se faire uniquement au niveau du cou.

4 - Conditions de réalisation du test

a) Le local

Les différentes pharmacopées précisent combien d'heures ou de jours avant le test le lapin doit être transféré du clapier dans le local du test; à quelles conditions de température, et éventuellement d'humidité, doit répondre le local où l'on se propose de réaliser l'essai.

b) Alimentation de l'animal pendant le test

A l'exception de la Pharmacopée allemande, muette sur ce point, les Pharmacopées s'accordent pour maintenir l'animal sans nourriture durant le test.

Les Pharmacopées britannique et italienne suppriment la boisson, les autres Pharmacopées accordent de l'eau au besoin.

c) Précautions spéciales

- Les Pharmacopées internationale et italienne n'en signalent pas.

- Les Pharmacopées française, belge, américaine, veulent que le lapin soit au calme, dans une pièce tranquille selon les Pharmacopées britannique et allemande.

5 - Température témoin

Les différentes pharmacopées précisent avec plus ou moins de détails comment doit être déterminée la température témoin, le nombre de lectures, le temps séparant les différentes lectures.

Elles précisent aussi les variations limites de cette température témoin, et font rejeter les lapins dont les températures ne se trouvent pas comprises dans ces limites.

6 - Essai proprement dit

a) Réchauffement du soluté à injecter

- Les Pharmacopées française, internationale, belge, américaine, japonaise, imposent de réchauffer le soluté à 38°,5 C.

- La Pharmacopée allemande demande que le produit soit à une température comprise entre 20 et 40° C; entre 30 et 40° C si le volume injecté est supérieur à 10 ml selon la Pharmacopée britannique.

b) Injection elle-même

- Les Pharmacopées internationale, belge, allemande, japonaise, font pratiquer l'injection quinze minutes après la prise de température témoin; les Pharmacopées française et américaine portent ce temps à 40 et 30 minutes.

- Le soluté doit être rendu isotonique, précisent les Pharmacopées internationale et japonaise.

- La dose injectée est de 10 ml/kg selon les Pharmacopées internationale, allemande, japonaise. Les Pharmacopées française, belge et britannique renvoient à chaque monographie pour connaître le volume à injecter.

- La Pharmacopée italienne précise que la dose à injecter doit être le 1/10ème de la dose normale pour l'homme, mais pas moins de 0,5 ml/kg, et pas plus de 10 ml/kg pour le lapin (ces limites sont mentionnées également dans la pharmacopée française).

c) Nombre et intervalle de prises de température

- Les températures doivent être prises une heure, une heure trente, deux heures, trois heures après l'injection, selon les Pharmacopées belge, allemande; et une heure, deux heures, trois heures après l'injection, selon les Pharmacopées internationale, américaine et japonaise.

- Selon la Pharmacopée italienne, la première prise de température a lieu 15 minutes après.

- Les Pharmacopées britannique et française demandent que les températures soient notées toutes les 30 minutes, dans les trois heures qui suivent l'injection.

7 - Interprétation - Codex français (9ème édition)

Interprétation des résultats - Selon les résultats obtenus, l'essai effectué d'abord sur 3 lapins, peut être répété sur d'autres groupes de 3 lapins, jusqu'à concurrence de 4 groupes. La substance satisfait à l'essai si la somme des réponses du premier groupe est inférieure à la valeur indiquée dans la deuxième colonne du tableau ci-après. Si la somme des réponses est comprise entre les valeurs indiquées dans la deuxième et la troisième colonnes du tableau, répétez l'essai comme indiqué ci-dessus. Si la somme des réponses est supérieure à la valeur donnée dans la troisième colonne, la substance ne satisfait pas à l'essai.

Nombre de lapins	La substance satisfait à l'essai si la somme des réponses n'excède pas:	La substance ne satisfait pas à l'essai si la somme des réponses est supérieure à :
3	1,15°	2,65°
6	2,80°	4,30°
9	4,45°	5,95°
12	6,60°	6,60°

§ 1 - Pharmacopée internationale 1955

- Le produit est pyrogène si 2 ou 3 lapins ont une élévation thermique égale ou supérieure à 0°6, et si la somme des élévations est supérieure ou égale à 2°1.

- Si un animal présente une élévation thermique de 0°6 ou plus, et si la somme des élévations ne dépasse pas 1°4, on reprend l'essai sur huit lapins.

- Le produit est pyrogène si quatre ou plus des huit lapins ont une élévation thermique de 0°6, ou si la somme des huit élévations dépasse 3°7.

§ 2 - Pharmacopée américaine

- Si aucun des lapins n'a une élévation de température égale ou supérieure à 0°6, ou si la somme des élévations n'est pas supérieure à 1°4, le produit est exempt de pyrogènes.

- Si un ou deux lapins a une élévation thermique égale ou supérieure à 0°6, ou si la somme des élévations est supérieure à 1°4, répéter le test sur huit autres lapins.

- Si pas plus de trois des huit lapins ont une élévation thermique égale ou supérieure à 0°6, et si la somme des élévations thermiques des huit lapins n'excède pas 3°7, le produit est exempt de pyrogènes.

§ 3 - Pharmacopée japonaise (7ème édition)

- Si deux ou trois lapins ont une élévation thermique de 0°6 ou plus, le soluté est pyrogène.

- Si seulement un lapin a une élévation égale ou supérieure à 0°6, ou si la somme des élévations thermiques des six lapins excède 1°4, le test est repris sur 5 lapins.

§ 4 - Pharmacopée belge (5ème édition)

- Si l'élévation est supérieure ou égale à 0°6 chez deux lapins au moins, l'essai est positif.

- Si un seul lapin a une élévation thermique de 0°6, ou si la somme des trois élévations est égale ou supérieure à 1°4, l'essai est douteux et repris sur cinq lapins.

- Une élévation thermique égale ou supérieure à 0°6 chez deux des cinq lapins fait considérer le produit comme pyrogène.

§ 5 - Pharmacopée italienne (7ème édition)

Pas de pyrogènes dans le produit si on ne note aucune élévation thermique inférieure à 0°6 par lapin, ou si la somme des trois élévations thermiques n'est pas supérieure à 1°4.

Le test est positif si les trois lapins ont une élévation de température égale ou supérieure à 0°6, et si la somme des élévations est égale ou supérieure à 2°1.

- Si seulement un ou deux lapins ont une élévation égale ou supérieure à 0°6, et si la somme est égale ou supérieure à 1°4, le test est répété sur cinq lapins.

- Le test est positif si 4 lapins ou plus utilisés dans les deux épreuves ont une élévation thermique égale ou supérieure à 0°6, ou si la somme des élévations thermiques des huit lapins est égale ou supérieure à 3°7.

§ 6 - Pharmacopée britannique (1963

- Le test est appliqué à trois lapins, et les résultats interprétés d'après le tableau.

- Si la somme des réponses du groupe est comprise dans les valeurs

données dans la 2ème ou la 3ème colonne, le test est répété sur d'autres groupes de trois lapins, jusqu'à un total de quatre groupes.

Nombre de lapins	Le produit ne passe pas le test si la somme des réponses excède:	Le produit passe le test si la somme des réponses n'excède pas:
3	2° 65	1° 15
6	4° 30	2° 80
9	5° 95	4° 45
12	6° 60	6° 60

§ 7 - Pharmacopée allemande (7ème édition)

- L'essai et la première répétition de l'essai seraient repris avec chaque fois trois lapins si la somme des carrés des élévations de température se trouve entre la première et la deuxième colonnes situées dans le tableau. L'essai est aussi recommencé si un lapin montre une élévation de 0°6. Dans l'interprétation des essais repris une fois et, le cas échéant, deux fois, on considérera les élévations de température obtenues lors de l'essai et essentiellement lors de l'essai de la première répétition. Un essai ou une reprise d'essai n'est pas valable si la moyenne des élévations de température de deux lapins est supérieure à 0°6, et si le troisième lapin montre une élévation de température supérieure à 0°6.

	Le produit à tester n'est pas exempt de pyrogènes si la somme des carrés des élévations de tempér. est plus grande que:	Le produit à tester est exempt de pyrogènes si la somme des carrés des élévations de tempér. n'est pas plus frande:
test lui-même	1,40	0,47
test répété n° 1	1,60	1,10
test répété n° 2	1,70	1,70

E - INCONVENIENTS DE LA METHODE

Deux nous paraissent essentiels. Ils sont dûs:

- au choix de l'espèce animale

- aux difficultés d'interprétation.

a) Choix de l'espèce animale

Pour les essais, toutes les pharmacopées utilisent le *lapin*, bien que d'autres animaux de laboratoire, chiens, cobayes, rats et souris par exemple, conviennent également (83 - 54 - 55).

La raison de ce choix tient vraisemblablement à l'administration intra-veineuse meilleure d'une préparation, à la tolérance de plus grands volumes injectés, et à la manipulation plus commode des animaux pendant les essais. La sensibilité des animaux aux substances pyrogènes nous semble n'avoir ici qu'un rôle de second plan (83 - 27 - 92).

En effet, une des conditions nécessaires pour une utilisation et une interprétation faciles du test est que les réponses des animaux enregistrées après injection intra-veineuse d'une substance pyrogène soient franches et reproductibles.

Différents facteurs influençant la réponse thermique du lapin semblent s'opposer à cette condition.

1. *Variations d'un individu à l'autre*

De nombreux auteurs rapportent les différences de sensibilité d'un animal à un autre. Certains lapins demeurent insensibles à l'injection, d'autres sont hypersensibles, d'autres encore, hyposensibles (57 - 33). La sensibilité des animaux varie encore selon:

- le sexe qui pourrait, selon DARE (28), avoir une influence sensible, les mâles donnant une hyperthermie plus élevée. D'autres, au contraire (60 - 47), considèrent qu'il n'existe pas de différence entre les sexes, et que le cycle des femelles est également sans importance;

- le poids minimal des animaux a été fixé à 1,800 kg; une limite supérieure n'est pas stipulée, bien qu'elle semblerait nécessaire. D'après

les essais de HERGOTT et KLAVEHN (47),les résultats des expériences faites sur des animaux de moins de 1,5 kg et de plus de 4 kg présentent une forte dispersion. Les animaux dont le poids excède sensiblement 2 kg auraient une sensibilité meilleure (33 - 82);

- l'âge lié au poids n'intervient que pour des animaux très jeunes ou très âgés, en relation avec le faible taux d'anticorps;

- la race, qui n'est pas déterminée avec la pharmacopée : des animaux de race pure peuvent être utilisés aussi bien que les animaux de croisement, à condition qu'ils aient présenté déjà un test préalable de sensibilité suffisante. Mais les races à tempérament calme, tel que le lapin de Bourgogne, sont préférables à des races plus excitables, comme le lapin à poil noir (38).

2. Variations individuelles

Si l'on observe des différences de sensibilité d'un individu à l'autre, il existe également, et tout aussi gênantes, d'importantes variations thermiques chez le même animal sous l'influence de divers facteurs.

Le lapin apparaît comme un réactif animal extrêmement inconstant du point de vue thermique. Sa température présente, en effet, des variations physiologiques non négligeables d'un jour à l'autre, et même d'une heure à l'autre; la température moyenne normale des lapins, évaluée de 38° à 38°8 par DORCHE et BOUTHIER (32) confirme cette observation.

Le conditionnement des animaux est de grande importance, la manipulation et la prise de température devant s'effectuer au calme, afin d'éviter tous facteurs émotionnels (41) dans un minimum de contraintes (28 bis), ces facteurs étant capables à eux seuls de provoquer une hyperthermie non négligeable. Toute activité musculaire durant trois minutes produit, chez chaque animal, une augmentation moyenne de + 0°8 (39). L'immobilité diminue au contraire cette température centrale (48). Même, la position des lapins peut à elle seule modifier la réponse thermique (76).

On connaît encore l'influence non négligeable des facteurs saisonniers et de la température ambiante (13).

4. Sensibilité comparée du lapin et de l'homme

Quel est le rapport entre les sensibilités du lapin et de l'homme? Si l'on vérifie sur cet animal les solutés utilisables en clinique, encore faudrait-il savoir comment extrapoler de l'animal à l'homme. Nous ne sommes pas très avancés dans ce domaine car il est difficile, en France, de faire des essais physiologiques sur l'homme.

Parmi les critiques qui ont été faites aux textes des pharmacopées, une des plus graves paraît être celle de CO-TUI et SCHRIFT (26), reprise par ARDY (44);d'après les chiffres rapportés par ces auteurs, l'homme serait environ deux fois plus sensible que le lapin aux pyrogènes provenant du bacille typhique. Ainsi, l'injection à des lapins de 10 cm3 (volume fixé par le Codex) d'un soluté pourra provoquer chez eux une hyperthermie inférieure à 0°6, alors que l'homme pourra réagir à l'injection d'un volume un peu supérieur à 5 cms3/kg (soit 300 cm3 pour un homme de 60 kg), dose évidemment assez faible.

D'autres expériences ont été faites: la plupart démontrent, vis à vis des endotoxines pyrogènes, une plus faible sensibilité chez le lapin que chez l'homme. L'hypothèse contraire est rarement soutenue (28 bis - 86). Des expériences plus récentes ont montré que la sensibilité de l'homme vis à vis de l'effet pyrogène devient plus grande avec l'augmentation de la dose que celle du lapin, ainsi que d'autres effets toxiques graves plus fréquent (78 - 53 - 41).

En conséquence, l'injection d'une dose plus élevée est donc souhaitable, partant du principe que, même si cette dose reçoit le qualificatif conforme, l'échantillon ne contiendra pas une quantité de substances pyrogènes provoquant la hausse minimale de température tolérée.

Autre intérêt: la sélection des lapins insensibles à forte dose, qui améliore les évaluations. Pour juger la nature pyrogène d'une nouvelle préparation pharmaceutique, des auteurs conseillent d'utiliser 10 à 16 % de la dose d'une prise prévue pour un homme adulte par kg de lapin (78). (De telles sélections sont prescrites par les pharmacopées française, est-allemande et roumaine).

5. Conclusions

La sensibilité, sinon anormale, du moins extrêmement variable du lapin a pour effet direct de modifier trop souvent les résultats qui deviennent difficilement interprétables.

En conséquence, et pour limiter cet effet, il faut multiplier les essais, augmenter les doses, ce qui apporte un surcroît de travail et de dépenses. Le coût trop élevé du lapin oblige à réduire le nombre d'animaux, à limiter les doses, et à utiliser ainsi des résultats statistiquement médiocres.

Toutes les exigences qu'imposerait une utilisation rationnelle du lapin dans le cadre du Codex ne peuvent être prises en considération par la plupart des Laboratoires, pour lesquels les impératifs économiques sont déterminants (du moins en ce qui concerne les tests internes ou tests d'orientations préliminaires).

b) Difficultés d'interprétation

1. Signification de l'élévation thermique

Ayant dénoncé au chapitre précédent l'instabilité thermique du lapin, on est en droit de se demander si la limite d'élévation thermique au-dessus de laquelle le produit doit être rejeté, n'est pas une donnée arbitraire, et si elle offre une sécurité suffisante.

Si l'on reprend les résultats rapportés par DORCHE et BOUTHIER (32), qui situent les fluctuations thermiques des lapins non inoculés entre - 3° C et + 3° C, on constate qu'avant même l'injection intraveineuse, il existe déjà un écart de 0°6.

D'autre part, HART et PENFOLD (48) notaient que l'essai témoin (*), avec la solution salée apyrogène, produisait un abaissement de température chez l'animal normal; donc, d'après les auteurs, une élévation de température inférieure à 0°6 est cependant significative. En tout cas, si l'on garde cette valeur, on a grand intérêt à augmenter le nombre d'animaux, afin d'éliminer le plus possible toutes réactions anormales.

2. Manque d'unité entre les pharmacopées

Si l'on compare les différents protocoles décrits antérieurement, on est frappé par les différences existant entre les pharmacopées, au niveau de l'interprétation des résultats.

3. Prise en considération de l'hypothermie

Une autre difficulté, lors de l'interprétation des résultats selon le Codex, tient à l'absence d'indications quant à la conduite à tenir lors d'obtention de températures négatives. L'hypothermie, autant que l'hyperthermie, n'est-elle pas une variation pathologique. Rien, en tout cas, ne permet de considérer qu'elle n'ait pas une signification biologique ou médicale.

4. Nombre de variables

Le test pyrogène du Codex français ne prend en considération, pour

---

* se rapporte au test selon la méthode de la 13ème édition de la Pharmacopée américaine.

Dans le cas de fortes doses, la mesure de la durée d'action semble d'un grand intérêt (M. LAUNOY).

. Facteur dose

Cette seconde variable n'est jamais prise en considération.

Les indications des pharmacopées sur la dose expérimentale à injecter ne se rapportent qu'à certaines préparations injectables figurant dans les différents Codex. La plupart des médicaments à usage parentéral non inscrits dans les pharmacopées sont toujours oubliés. Ceci nous paraît un oubli majeur pour deux raisons:

- la réponse thermique de l'animal n'est pas indépendante de la dose,

- la différence de sensibilité de l'animal et de l'homme à l'égard des pyrogènes est fort intéressante à étudier dans ce contexte.

1) Rapport entre dose et activité pyrogénique

Selon différents auteurs (92 - 35 - 90 - 91 - 42 - 31), la réponse pyrogène dépend de la dose. Plus particulièrement, TENNENT et OTT (82), puis WYLLIE et TOOD (90 - 91) se sont préoccupés des variations de l'hyperthermie en fonction de la dose injectée. Prenant un soluté pyrogène et injectant à des séries de lapins des doses croissantes, ils ont constaté que l'hyperthermie croissait comme le logarithme de la dose. Cette relation n'est valable que pour un certain intervalle de doses. Au-delà d'une certaine dose, on observe un plateau, puis une diminution de l'hyperthermie (57). EICHENBERGER (35) a noté ce phénomène avec le Pyrexal. LECHAT (57) le retrouve avec les vaccins antigonococciques et antityphoïdiques, et HRIBALOVA et SCHUH (50) l'ont confirmé avec l'endotoxine de Salmonella typhi.

La forme de la courbe Action/Dose et la comparaison des différentes courbes correspondant à des doses différentes sont riches en enseignements; elles permettent:

- de voir nettement s'il existe une loi dose/effet,

- de connaître le seuil d'activité pyrogène d'un produit,

- de comparer la sensibilité individuelle de différents animaux,

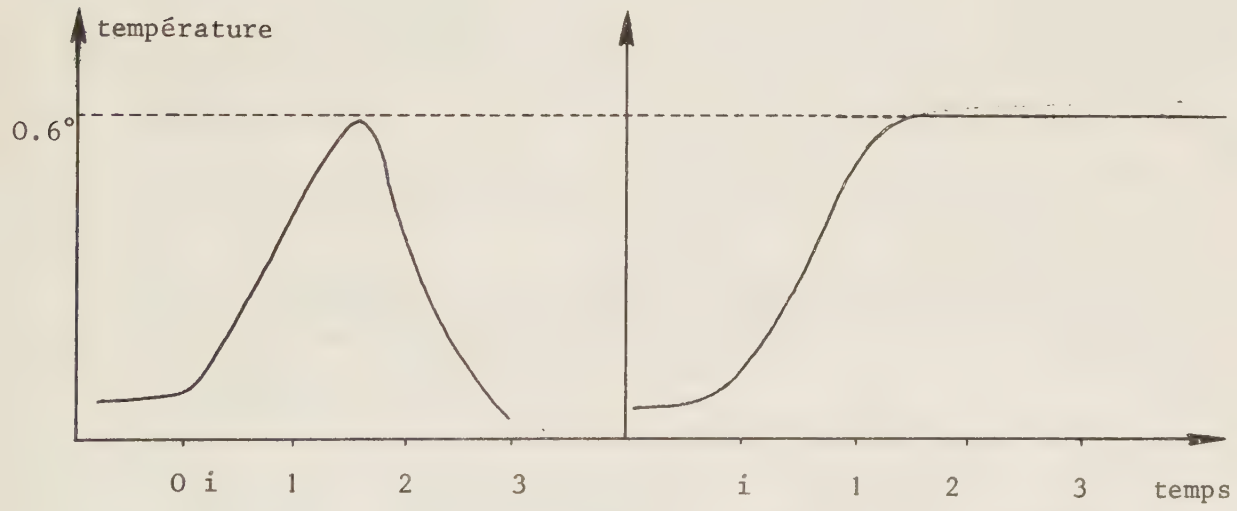
- de différencier, selon DELEAU et LECHAT (30 bis) les pyrogènes bactériens des hyperthermisants périphériques: ainsi, avec le vaccin antigonococcique, la courbe passe par un maximum et tend à redescendre, tandis qu'avec le dinitrophénol elle croît de façon exponentielle.

chaque animal qu'une valeur numérique qui est dans l'intervalle fixe de trois heures, l'écart maximal de température noté. Cette valeur est une grandeur brute qui ne dépend ni du facteur temps, ni du facteur dose. Le test du Codex est de ce fait un test du "tout ou rien", donc peu sensible et insuffisant. A la limite, seule l'interprétation des résultats très pyrogènes peut être prise en considération. Un tel test ne se prête guère au contrôle de produits faiblement pyrogènes et est nettement insuffisant pour le contrôle de nombreux produits pharmaceutiques, notamment les vaccins bactériens qui se situent à la limite de la pyrogénicité.

. Facteur temps

En ne considérant que l'écart de température maximum observé, la durée complète de la période d'hyperthermie n'est pas prise en compte.

Imaginons deux produits qui, après injection intra-veineuse, donneraient les courbes suivantes:



Ces deux produits sont reconnus comme également pyrogènes par le Codex.

Le délai d'installation de l'hyperthermie et son maintien chez l'animal inoculé nous semblent plus significatifs et plus intéressants que sa valeur brute réelle.

G. BERANGER et L. JOUBERT (10 - 11 - 12), dans leur système d'unités néoprobits, s'attachèrent à démontrer l'importance du facteur temps dans les titrages sur animaux. Cette méthode fut d'ailleurs proposée pour l'interprétation des essais pyrogènes (39).

CHARONNAT et LECHAT (20), au cours de leurs recherches sur la nature des pyrogènes dans les solutés injectables, définirent un indice pyrogénique qui se déterminerait avec quelques points de la courbe/ dose/ hyperthermique et reflète l'activité du pyrogène.

Enfin, et ceci nous semble particulièrement intéressant, cette courbe action/dose a permis de mieux connaître la sensibilité comparée du lapin et de l'homme.

2. Rapport entre dose et toxicité aiguë

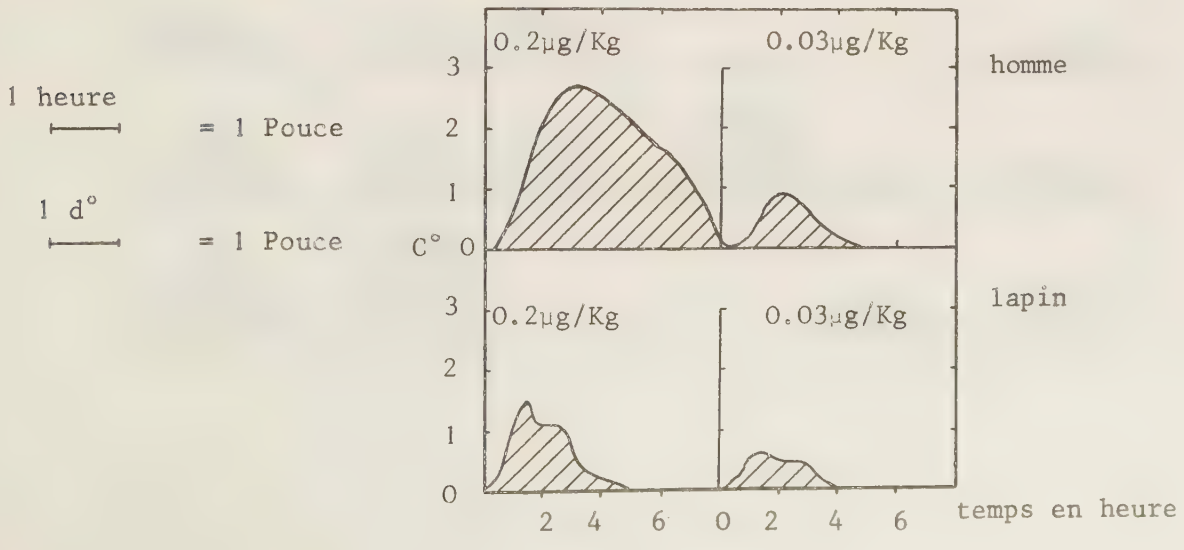
EICHENBERGER (34) admet que la dose pyrogénique minimale équivaut au millionième de la dose léthale chez le même animal (lapin) et par la même voie (intra-veineuse). Un tel écart n'est pas forcément rassurant et ne suffit pas pour assurer que la présence de pyrogènes bactériens dans un soluté médicamenteux injectable est inoffensive pour l'homme.

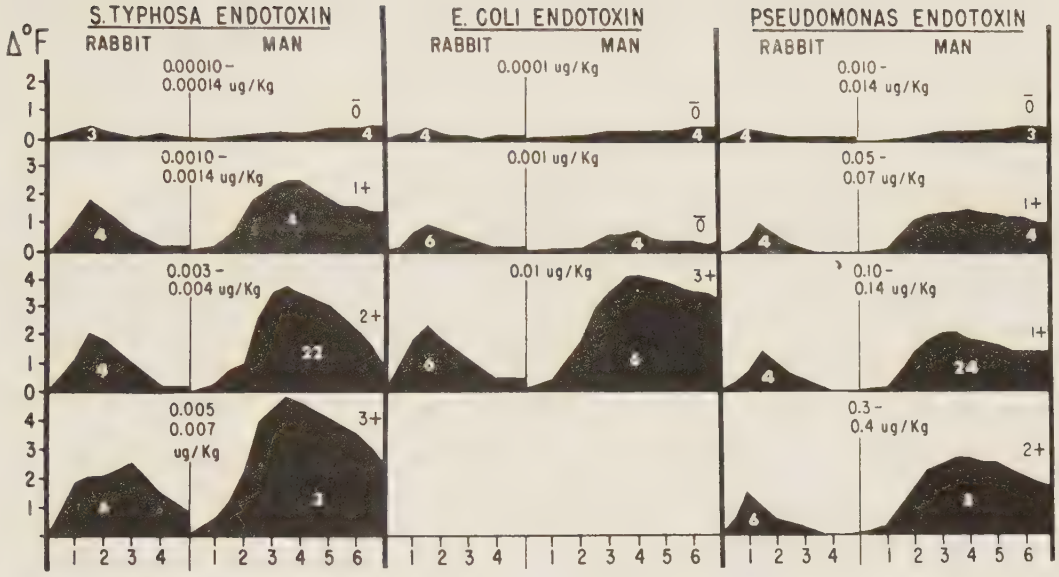
Provoquer un accès de fièvre peut représenter une acquisition plus ou moins grave selon l'état pathologique du malade; des doses infimes peuvent entraîner des accidents chez les cirrhotiques par exemple (75 - 47 bis); l'expérimentation confirme d'ailleurs que la réactivité aux endotoxines peut être modifiée, soit par les injections préalablement subies, soit encore par le type de bactéries présentes dans le tube digestif (58).

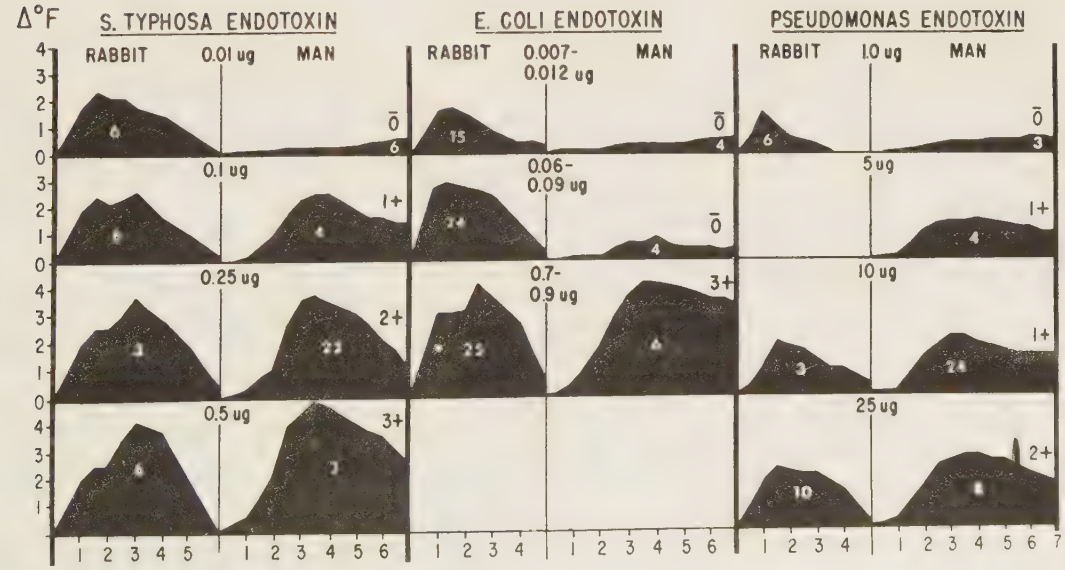
Pour cette raison, il était intéressant de connaître la différence de sensibilité de l'animal et de l'homme à différentes doses.

Nous transposons ici les résultats obtenus par KEENE, SILBERMAN et LANOY (53), expériences portant sur lapins et hommes atteints de divers cancers, ceux de GREISMANN et HORNICK (41) qui expérimentèrent sur lapins et des hommes en bonne santé.

KEENE - SILBERMAN and Maurice LANDY







D'après GREISMAN et HORNICK (41)

Mis à part le grand intérêt que représente ce travail pour la connaissance de la sensibilité comparée entre le lapin et l'homme, la méthode qu'ils emploient pour l'interprétation des résultats nous intéresse particulièrement; cette méthode caractérise l'accès de fièvre par la surface comprise entre la courbe et la ligne représentant la température normale. C'est "l'index fébrile" proposé 14 années plus tôt par BEESON (9). Il tient compte, à la fois de la durée et de l'intensité de l'hyperthermie.

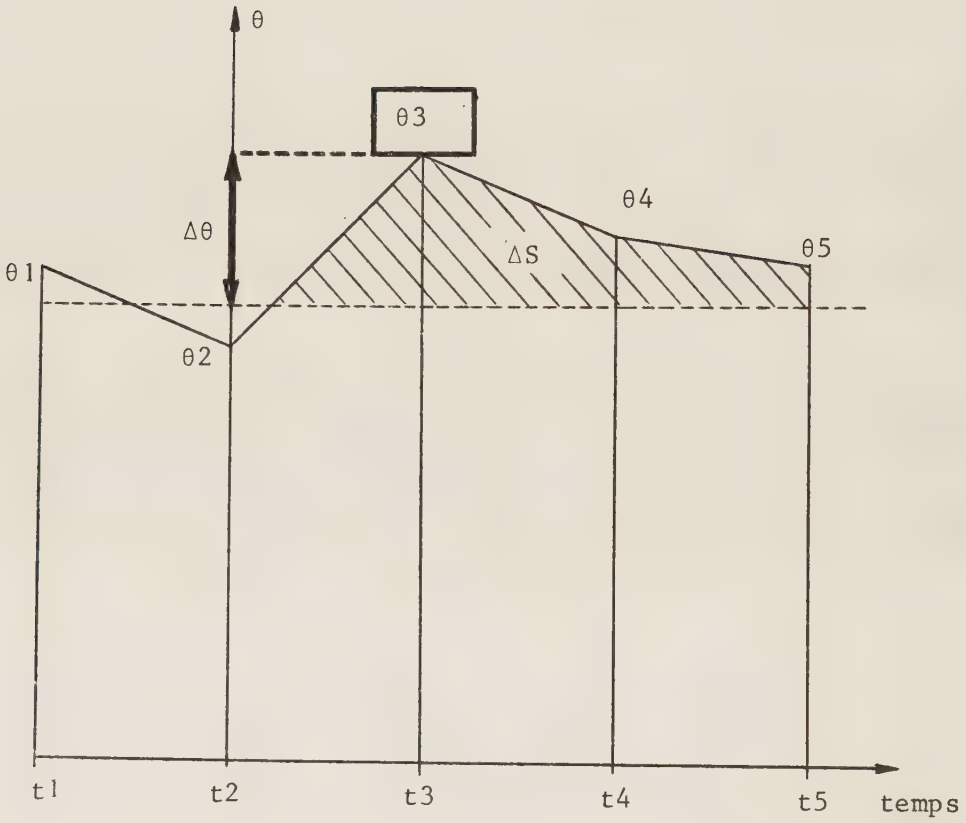
e) Conclusions

Si le test Codex n'a pas d'autre but que de vérifier l'absence de pyrogènes, et qu'il n'a pas été établi en vue d'un dosage, il comporte cependant un début de quantification, puisqu'il fixe le volume à injecter (10 cm 3) et détermine avec précision un seuil d'élévation de température au-dessus duquel le produit doit être rejeté. Une perte d'information est due au fait que la chronologie des paramètres quantitatifs contrôlés n'est pas prise en cause.

On peut se demander si une méthode plus fine d'utilisation des lectures (sans modification du protocole expérimental, donc sans complication opératoire), ne permettrait pas d'analyser de plus près l'effet pyrogène, et en particulier de quantifier cet effet en fonction de la durée d'hyperthermie ou de la dose de pyrogènes administrés, comme l'ont fait KEENE, SILBERMANN, LANDY, GREISMAN et HORNICK dans les expériences que nous avons rapportées.

- oOo -

GRAPHIQUE N°2



PARTIE EXPERIMENTALE

I - PROPOSITION D'UNE NOUVELLE METHODE STATISTIQUE DANS L'INTERPRETATION DU TEST PYROGENE

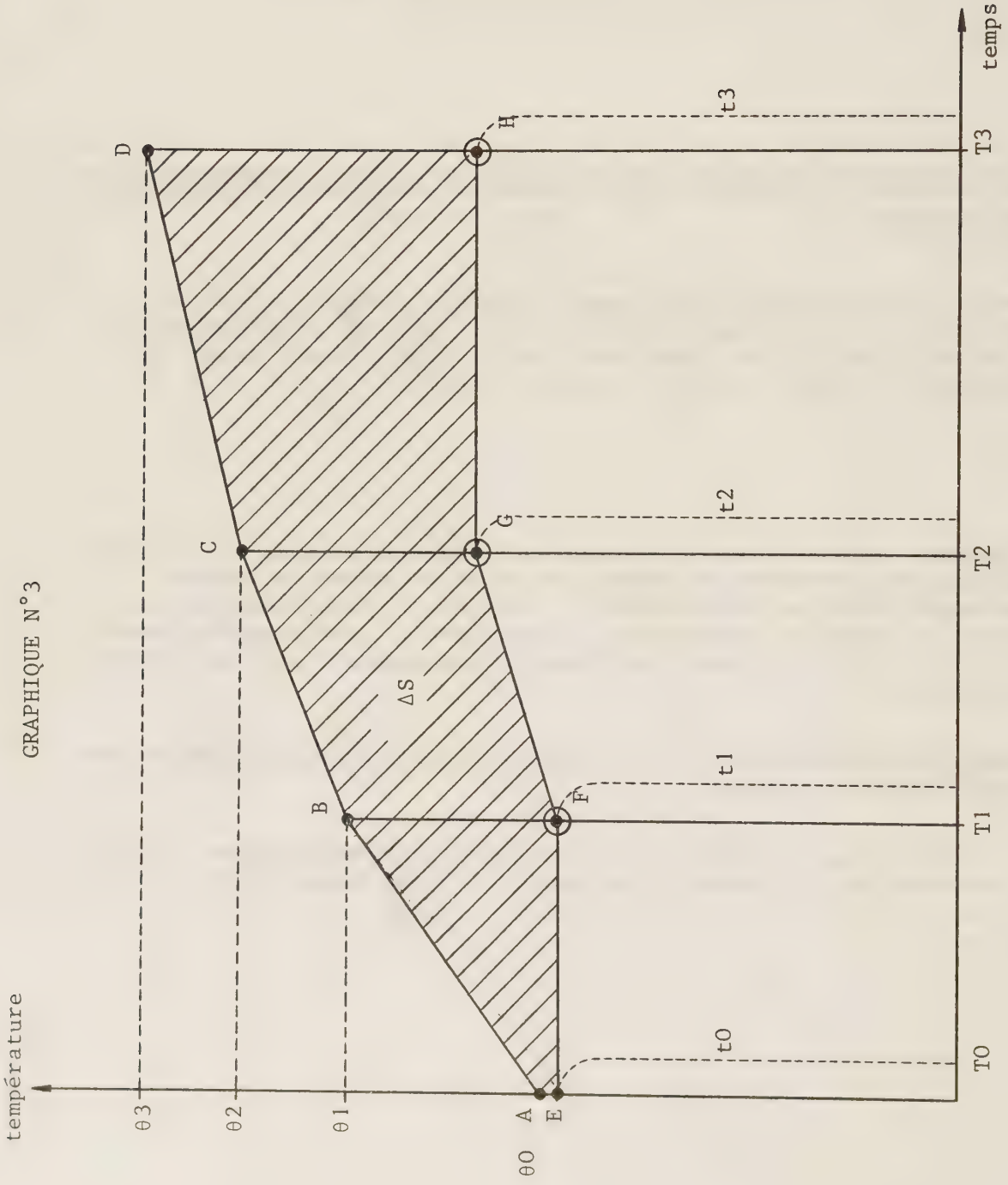
Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur BERANGER et Monsieur STELLMANN pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée dans l'élaboration de ce chapitre, et pour avoir mis à notre disposition l'exposé de leur méthode biomathématique, avant même sa parution.

Pour aborder quantitativement le problème d'interprétation des résultats de l'essai des substances purogènes (80) nous intégrons le facteur "chronologie" dans les comparaisons de cinétiques, en estimant la surface sous la courbe de température, comme l'ont proposé certains auteurs (9 - 53 - 41 - 89 - 46), sans entraîner malheureusement son application et sa diffusion°.

On suggère de remplacer par le Δ S (accroissement de surface défini par ailleurs) le $\Delta\ \Theta$ du Codex.

Le Δ S a l'avantage de faire intervenir toutes les températures Θ 1 à Θ 5 mesurées sur un animal, alors que le $\Delta\ \Theta$ du Codex ne fait intervenir que Θ 1 et Θ 2 et la plus grande des valeurs Θ3 Θ4 Θ 5. (graphique n° 2)

GRAPHIQUE N°3



A - PRINCIPE GENERAL DE CALCUL

1° - Estimation de ΔS

Il est commode de prendre un exemple.

Soit deux lots d'animaux randomisés:

- animaux témoins - animaux tests -

Le lot témoin reçoit une injection d'un solvant apyrogène servant à la mise en solution ou dilution d'un produit pyrogène à tester.

Les températures des animaux sont prises individuellement aux temps:

$T = 0$; $T = +1$; $T = +2$; $T = +3$

Les températures moyennes sont reportées sur le graphique n° 3. Il s'agit de tester si la surface entre les deux cinétiques témoin et test est significative.

Compte tenu des erreurs expérimentales dues aux variances des animaux sur chacune des prises de température.

Cette surface ΔS = ABCDHGFE est égale à

$$= ABCDT_3T_0 - EFGHT_3T_0$$

a) Détermination de $ABCDT_3T_0$

Cette surface peut être décomposée en 3 surfaces:

$$ABCDT_3T_0 = ABT_1T_0 + BCT_2T_1 + CDT_3T_2$$

Si nous appelons t_0 t_1 t_2 t_3 les températures des animaux témoins aux temps 0, 1, 2, 3, et a, b, c, les intervalles de temps=

$$a = T_1 - T_0$$

$$b = T_2 - T_1$$

$$c = T_3 - T_2$$

Nous obtenons:

$$ABCD\ T_3\ T_0 = 1/2\ \{ (t_0+t_1)\ a + (t_1 + t_2)\ b + (t_2 + t_3)\ c \}$$

$$= 1/2\ \{ a\ t_0 + (a+b)\ t_1 + (b + c)\ t_2 + c\ t_3 \}$$

b) Estimation de $EFGHT_3\ T_0$ I

Avec Θ_0, Θ_1 , Θ_2 , Θ_3 , les températures des animaux testés aux temps 0, 1, 2, 3, nous obtenons:

$$EFGHT_3\ T_0 = 1/2\ \{a\Theta_0 + (a + b)\ \Theta_1 + (b +c)\ \Theta_2 + c\ \Theta_3 \}$$

II

c) Estimation de ΔS = ABCDEFGH

Il s'agit de la différence entre I et II , soit :

$$\Delta S = 1/2\ \{ a\ (t_0 - \Theta_0) + (a + b)\ (t_1 - \Theta_1) + (b+c)(t_2-\Theta_2)+ c(t_3-\Theta_3)\}$$

$$\Delta S = 1/2\ \{ a\ \Delta\Theta_0 + (a+b)\ \Delta\ \Theta_1 + (b+c)\ \Delta\ \Theta_2 + c\ \Delta\ \Theta_3 \}$$

III

Les $\Delta\ \Theta$ étant les écarts de température entre les animaux témoins et les animaux testés.

2° - Estimation de la variance de ΔS

Soit var. (t_0), var.(Θ_0), var. (t_1), et var. (Θ_1), les variances de chaque point expérimental; et nt, nO, nt, nO, etc... les effectifs de chaque pesée. La variance de S : VAR (ΔS) s'exprimera sous la forme:

$$VAR\ (\Delta S) = 1/4\ \{ a^2\ (\frac{var(to)}{n\ to} + \frac{var\ (\Theta o)}{n\ \Theta o}) + (a+b)^2\ (\frac{var\ (t1)}{n\ t1} + \frac{var\ (\Theta 1)}{n\ \ \Theta 1}\ \}$$

$$+ b+c)^2\ (\frac{var\ (t2)}{n\ t2} + \frac{var\ (\ \Theta 2)}{n\ \Theta 2} + c^2\ (\frac{var\ (t3)}{n\ t3} + \frac{var\ (\ \Theta 3)}{n\ \ \Theta 3}\ \}$$

IV

Par une étude préalable du problème posé, et en effectuant certaines transformation (par exemple en utilisant le log. 10 de la variable), les variances sont égalisées. Si, par ailleurs, le nombre de sujets est constant, la formule IV devient avec var. = variance constante pour chaque point, et n = effectif constant, soit:

$$\text{VAR. } (\Delta S) = \frac{\text{var}}{4\,n} \left\{ a^2 + (a+b)^2 + (b+c)^2 + c^2 \right\} \qquad \text{V}$$

3° - Comparaison de deux cinétiques

La comparaison de 2 cinétiques s'effectuera par un test t de STUDENT sur la surface intermédiaire:

$$t = \frac{\Delta S}{\sqrt{\text{VAR } (\Delta S)}}$$

le nombre de degrés de liberté étant la somme des obsérvations - 2 .

B - APPLICATION AU TEST DU POUVOIR PYROGENE SUR LAPIN

Dans ce cas, le lapin test est son propre témoin; en effet, il suffit de relever la température rectale du lapin avant l'injection pour obtenir sa température de base par le calcul de la température moyenne.

Nous utiliserons, dans la formule III, l'écart de température aux divers temps d'observation par rapport à la température de base du lapin. Plusieurs lapins étant nécessaires pour calculer une variance, nous calculons une ΔS pour chacun des lapins. Le test de t s'effectuera par:

$$t = \frac{\Delta S \text{ moyen}}{\sqrt{\text{Var } (\Delta S/n)}}$$

où VAR. (ΔS) est la variance expérimentale estimée sur les ΔS des différents lapins.

Un exemple de calcul est traité dans le tableau n°1 et explicité sur le graphique n°4.

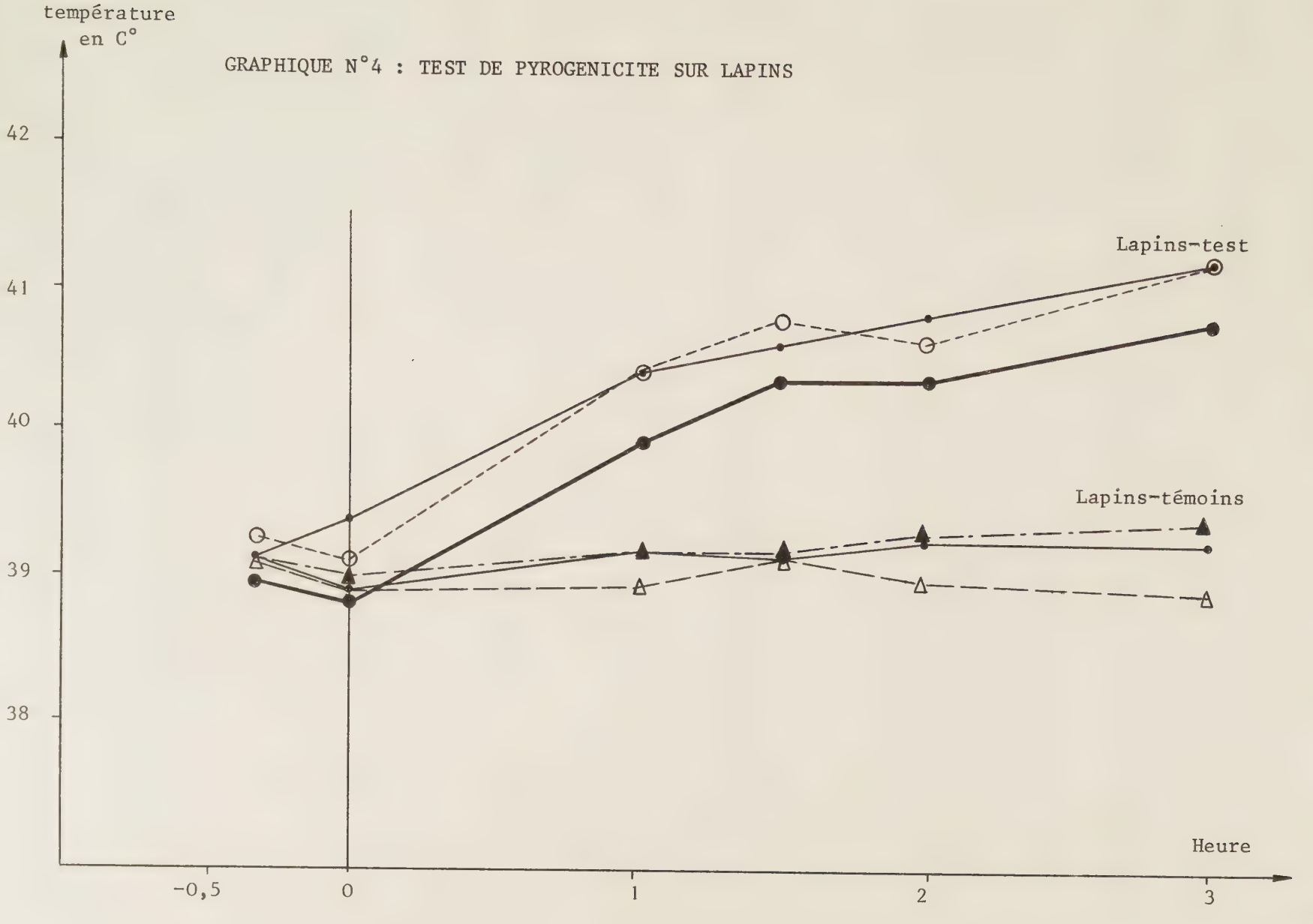
TABLEAU N° I : EXEMPLE D'UN TEST PYROGENICITE SUR LAPIN

(°)= Test t par rapport à la température de base des lapins

(°°)= Test t entre les 2 groupes

		Température avant l'essai			Température après l'essai				Ecart individuel de surface	Moyenne des écarts de surface avec variance	Comparaison des 2 groupes
		T 1 0.3h	T 2 0	Moyenne T1+T2 Base	+ 1h	+ 1.5h	+ 2h	+ 3h			
1	Intervalles de temps				1	0.5	0.5	1			
2	Somme des intervalles de temps				1+0.5 =1.5	0.5+0.5=1	0,5+1=1.5	1+0=1			
3	Lapin témoin										
	A. Température Ecart x fig.(2)	39.2	39	39.1	39.2 0.1x1.5	39.2 0.1x1	39.3 0.2x1.5	39.3 0.2x1	0.375	0.2	
	B. Température Ecart x (2)	39.2	39.1	39.15	39.2 0.05x1.5	39.2 0.05x1	39.3 0.15x1.5	39.4 0.25x1	0.425	Var=0.12 Test t (°) = 1	
	C. Température Ecart x (2)	39.2	39	39.1	39 0.1x1.5	39.2 0.1x1	39 0.1x1.5	38.9 0.2x1	0.20	Non signific.	(°°) t=16.25
4	Lapin-test										
	D. Température Ecart x (2)	39	38.9	38.95	40 1.05x1.5	40.4 1.45x1	40.4 1.45x1.5	40.8 1.85x1	3.525	3.652 Var = 0.0158 t=50 Hautement signif.	
	E. Température Ecart x (2)	39.3	38.2	39.25	40.5 1.25x1.5	40.8 1.55x1.5	40.7 1.5x1	41.2 1.85x1.5	3.775		
	F. Température Ecart x (2)	39.2	39.4	39.3	40.5 1.2	40.7 1.4x1	40.8 1.5x1.5	41.2 1.9x1	3.675		

GRAPHIQUE N°4 : TEST DE PYROGENICITE SUR LAPINS



C - NOTION DE DOSE STIMULANTE LIMITE

Nous avons montré précédemment comment intégrer le temps d'observation par le calcul d'une surface sous la courbe cinétique sans envisager la variation de cette surface avec la dose du produit inoculé.

Maintenant, on propose d'étudier la loi dose-effet d'un produit donné par l'intégration du temps dans la surface sous la courbe . Il en résulte la définition d'une dose stimulante limite: D.S.L. La dose stimulante limite est la dose du produit donnant pour une période donnée une cinétique de la variable aléatoire étudiée, identique à celle d'un groupe témoin testé parallèlement; c'est la dose seuil à partir de laquelle la moindre augmentation de dose déclenche l'éffet étudié, soit ici l'effet pyrogène.

1 - Exposé du modèle

Les calculs des surfaces sous la courbe sont effectués selon le processus décrit précédemment. Pour chacune des doses, nous obtenons une surface et une variance. Il s'agit ensuite de vérifier la loi dose-effet du produit.

Pour chaque dose nous estimons la différence

$$\Delta S = \text{Surface dose} - \text{Surface témoin.}$$

La variance de cette différence étant la somme:

$$\text{Variance } (\Delta S) = \text{Variance surface} + \text{Surface témoin.}$$

Nous obtenons ainsi $\Delta S1$ $\Delta S2$ $\Delta S3$

et Var ($\Delta S1$) ; Var ($\Delta S2$) ; Var ($\Delta S3$)

2 - Estimation de la D.S.L.

Nous estimons une corrélation :

$$I \quad y = \Delta S = b\,X + a \quad \text{avec } X = \text{dose}$$

Lorsque les variances Var ($\Delta S1$), Var ($\Delta S2$), Var ($\Delta S3$) sont très inégales, nous estimons une régression en pondérant chaque point par

$$W = \frac{I}{\text{variance}} \qquad (70)$$

si le test t sur la pente b est significatif, la loi dose-effet du produit

est démontrée. La non significativité de b est due parfois au manque de linéarité de la relation (I), que l'on peut améliorer par certaines transformations sur les données, par exemple log dose, log poids, log organes/poids ou $\sqrt{\text{variable}}$. Des études préalables sont nécessaires pour la justification de telles transformations.

La dose stimulante limite (D.S.L.) est telle que $\Delta S = 0$

$$D.\ S.L. = -\frac{a}{b}$$

Estimation de la variance de D.S.L.

Pour une valeur donnée de Y nous avons:

$$\text{I} \qquad X = \bar{X} + \frac{Y - \bar{Y}}{b}$$

avec $\bar{X}$ = moyenne des X

$\bar{Y}$ = moyenne des T

La variance de X est estimée par l'approximation (2)

$$\text{II} \qquad Var\ (X) = \frac{Var\ (Y) + Var\ (\bar{Y})}{b^2 + \frac{(Y - \bar{Y})^2 var\ (b)}{b^4}}$$

var (b) = variance de la pente b

var (Y) = variance des Y

var ($\bar{Y}$) = variance des $\bar{Y}$

Puisque Y est choisi var (Y) est annulée; par ailleurs nous pouvons exprimer:

$$Var\ (\bar{Y}) = Var\ (Y)\ \frac{1 - r^2}{N}$$

avec r = coefficient de corrélation

N = nombre de couples X et Y

La variance marginale étant $Var\ (Y) = Var\ (Y)\ (1 - r^2)$ pour la D S L $Y = 0$

La formule (II) s'exprime sous la forme:

$$\text{III} \qquad Var\ (D.S.L.) = \frac{1}{b^2}\ \left\{ \frac{Var\ (Y)}{N} + \frac{\bar{Y}^2\ var\ (b)}{b^2} \right\}$$

Cette dernière formulation montre que la variance de la D.S.L. sera d'autant plus faible:

a) que la pente b sera élevée

b) que l'extrapolation de la D.S.L. par rapport au centre de gravité des résultats expérimentaux sera faible, car $\bar{Y}$ sera petit;

c) que la corrélation entre X et Y est forte car $\frac{Var\ (b)}{b^2}$ sera faible.

3 - Application au test de Pyrogénicité sur lapin

Un standard Pyrogène O.M.S. constitué d'un extrait de Shigella, ampoule contenant 2 mg d'antigène somatique "O" purifié, lyophilisé de SHIGELLA DYSENTERIAE (4) a été testé à doses variables sur 33 lapins dans les Laboratoires de l'Institut MERIEUX à MARCY L'ETOILE.

Pour chaque lapin, nous estimons un ΔS selon le processus défini précédemment.

Les résultats sont transcrits dans le tableau n° 2 et explicités sur le graphique n° 5.

Les estimations des limites de la D.S.L. à la probabilité 0,95, donnent 0,0056 mg/ml < D.S.L. < 0,0038 mg/ml.

Ces résultats confirment la sensibilité du test et sa précision, malgré la variabilité biologique assez étendue des lapins, et démontre la linéarité de la réponse des lapins dans la zone des doses testées. Cette D.S.L. peut être une unité de base, valide, pour comparer certains produits à ce standard pyrogène.

D - CONCLUSION

Le procédé biomathématique proposé permet de mesurer, en fonction des doses de produits testés, de nombreux critères biologiques évoluant selon des cinétiques parfois complexes.

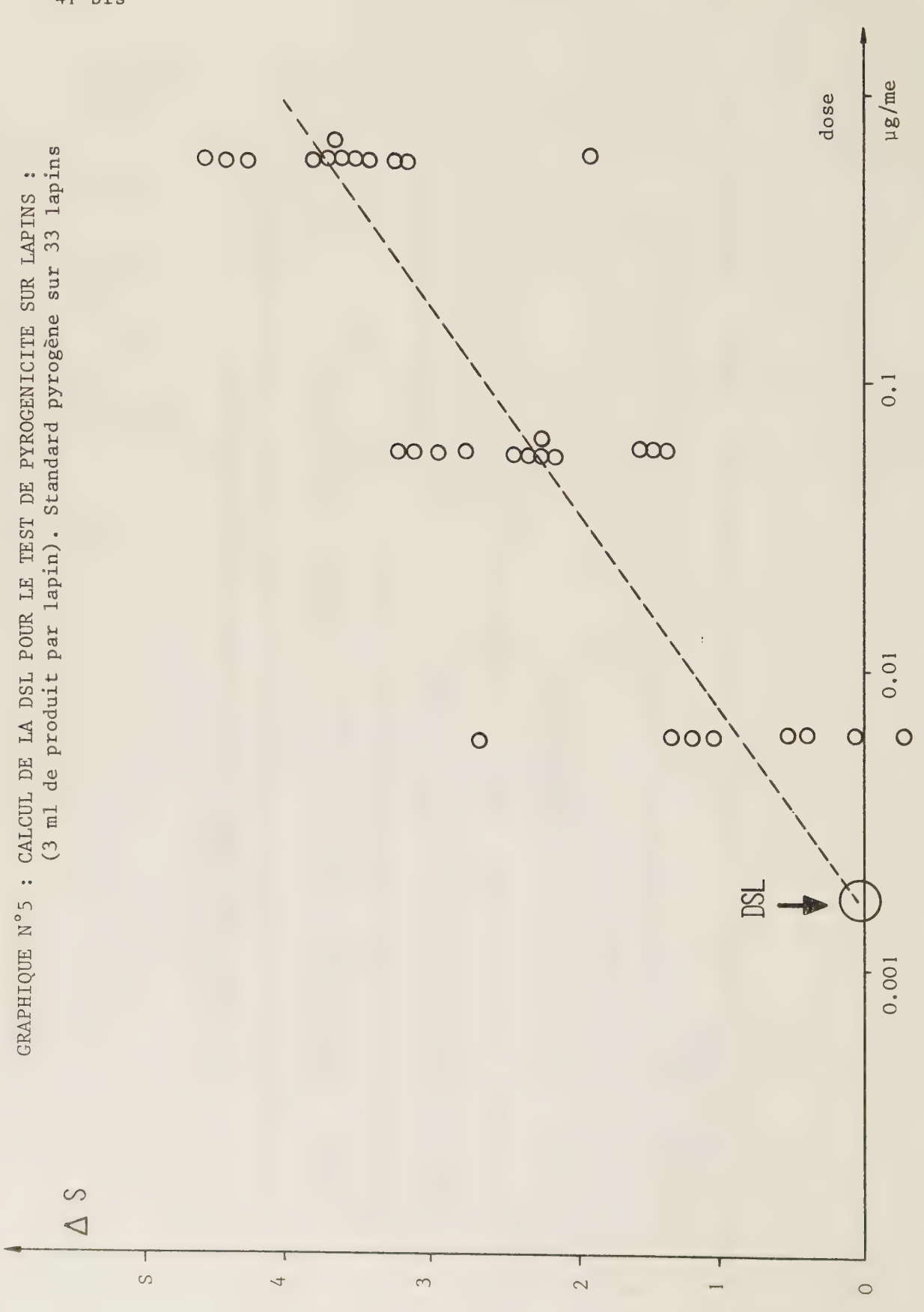
La variabilité biologique des sujets est pondérée par l'utilisation de la surface sous la courbe cinétique: chaque valeur expérimentale recueillie est utilisée chronologiquement, ce que l'analyse de variance ne permet pas de réaliser.

TABLEAU N°2 : TEST DE PYROGENICITE SUR LAPINS : STANDARD PYROGENE SUR 33 LAPINS . CALCUL DE LA DSL.

DOSE mg/ml	Δ S individuels sur 33 lapins	Δ S moyen	CALCUL DE LA DSL X = log (dose x 1000)
0.6 (°)	3.3 - 1.9 - 3.62 - 4.57 - 3.6 - 3.7 4.25 - 4.4 - 3.2 - 3.52 -3.77 -3.67	3.62	S = 1.39 X - 0.22 log DSL = 0.18 + 0.41 (°°) soit 0,00056<DSL<0.0038 mg/ml N_2 = 33 S pente = 0.0241 S^2y = 0.485
0.06	1.35 - 2.12 - 2.4 - 1.5 - 2.95 -2.3 2.25 - 3.2 - 2.25 - 3.12-2.77 -1.52	2.31	
0.006	0.05 - 0.42 - 0.47 - 1.2 - 1.07 2.65 - 0.54 - 1.35 - 0.23	0.82	

(°) chaque lapin reçoit une injection intraveineuse de 3 ml
(°°) limites à p = 0.95

GRAPHIQUE N°5 : CALCUL DE LA DSL POUR LE TEST DE PYROGENICITE SUR LAPINS :
(3 ml de produit par lapin). Standard pyrogène sur 33 lapins



II - LE TEST PYROGENE CHEZ LE RAT

Ayant pris connaissance des difficultés présentées par l'essai des substances pyrogènes, tel qu'il est officiellement décrit par les différentes pharmacopées, difficultés tenant:

- d'une part au matériel utilisé, le lapin,
- d'autre part à l'interprétation même du test,

et dans le but d'apporter quelques améliorations à ce test Pyrogène, nous nous sommes proposée:

- de substituer au lapin un animal économique et homogène: le rat,
- d'utiliser, pour l'interprétation de nos résultats, la méthode statistique exposée précédemment.

A - LE RAT

1 - Rappel des travaux antérieurs

Les résultats des rares expériences faites sur le rat concernant les effets des pyrogènes bactériens chez ces animaux sont contradictoires. MORFAN (47), après injection d'une suspension bactérienne de Salmonella typhosa aux rats, constate une hyperthermie. TAL et OLITZKI (81) confirment cette observation avec Shigella dysenteriae. TENNENT et OTT (82) affirment, sans donner de références, que les pyrogènes bactériens ne produisent pas d'élévation de la température rectale chez le rat. SMITH et HAMBOURGER (79) notent une hyperthermie uniquement après l'injection de vaccins antityphoïdiques, et pour d'autres vaccins une légère hyperthermie suivant une hypothermie initiale. LECHAT (59), comparant les réactions fébriles du lapin et du rat après injection intraveineuse de vaccin antigonococcique, conclut que les doses nécessaires pour obtenir la même élévation de température sont au moins dix fois plus fortes chez le rat que chez le lapin. WINTER et NUSS (88), plus récemment, obtiennent des résultats satisfaisants, dans des conditions rigoureusement suivies. L'injection intra-péritonéale de lipopolysaccharides d'Escherichia coli, à la dose de 0,5 mg/kg, produit après un temps de latence de 5 heures une hyperthermie de 1°,5 C, stabilisée deux heures environ. Après une étude comparée des courbes obtenues sur lapin et sur rat, ils constatent que la courbe d'hyperthermie du rat n'a pas le caractère

biphasique de celle du lapin, et présente un temps de latence plus long.

2 - Raisons ayant motivé son choix

Animal économique, son prix de revient ne dépasse pas 3 francs par animal, ce qui permettrait d'augmenter le nombre d'expériences et d'obtenir des résultats statistiquement meilleurs.

- Son poids minime entraînerait une réduction des doses par animal, et l'utilisation de plus faibles quantités de produit.

- Son homogénéité, due au fait que des lignées de rats sont à présent parfaitement connues et contrôlées, ce qui pourrait peut-être diminuer les facteurs de variabilité.

- Malgré des résultats contradictoires des travaux antérieurs, ceux de WINTER et NUSS (88) laissent espérer une sensibilité suffisante. Si le lapin reste l'animal imposé par la pharmacopée pour le test final, officiel, rien ne s'oppose, s'il remplit toutes ces conditions, à ce qu'il soit préféré pour les premiers essais d'orientation .

B - EXPERIMENTATION

Schéma d'expérimentation:

1° - Etude des variations thermiques de la population normale de rats.

2° - Etude des variations thermiques dues aux manipulations.

3° - Contrôle de l'effet pyrogène de différents produits sur rats.

1° - Variations thermiques de la population normale de rats

a) But recherché

Etablir la température rectale normale de diverses populations de rats de sexe et de poids différents.

Par une analyse statistique, étudier les variations de cette température en fonction de différents facteurs: sexe et poids essentiellement,

et déterminer ainsi les critères et les conditions idéales de nos expériences futures.

b) Plan expérimental

- Matériel

Rats mâles ou femelles de 5 classes de poids: 150 - 200 g, 200-250 g, 250 - 300 g, 300 - 350 g, 350 - 400 g.

- Conditions

Animaux soumis à une diète hydrique de 12 heures, séparés dans des cages individuelles depuis la veille.

Manipulations s'effectuant dans le calme, toute perturbation extérieure se traduisant par une élévation notable de la température rectale.

Température de la salle: 20° C.

- Expérience

5 prises de température successives, à 1 heure d'intervalle pendant

5 heures, à l'aide d'un thermomètre étalonné (par 10) introduit dans le rectum à une profondeur fixe de 2 cm. (Ce détail nous semble de grande importance ayant remarqué, au cours de nos expériences, d'importantes variations thermiques en fonction de cette profondeur). Par mesure de précaution, nous limitons cette erreur grâce à un arrêt en caoutchouc fixé à 2 cm de l'extrémité du thermomètre.

- Résultats

Les résultats obtenus sont reportés dans les tableaux 4 à 11.

Tableau n° 4 Rats mâles 150 - 200 g

1	37,5	37,7	37,5	37,5	37,6
2	37,3	37,5	37,3	37,3	37,3
3	37,2	36,5	37	37,5	37,4
4	37,2	37,5	37,4	37,4	37,7
5	37,7	37,8	37,8	37,8	37,7
6	37,1	37,8	38	37,5	38,1
7	37,4	37,5	37,4	37,7	37,7
8	37,7	38	38	38	38,3

Tableau n° 5 Rats femelles 150 - 200 g

1	37,3	37,7	37,5	38	37,9
2	37,4	37,6	37,4	37,8	38,3
3	37,2	37,6	38,5	38,4	38,4
4	37,5	38,1	38,3	38,1	38
5	38	38	38,3	38	38,5
6	37,3	37,9	38	37,7	38,3
7	37,9	37,9	37,8	37,8	38
8	37,8	38,2	38,2	37,9	37,8

Tableau n° 6 Rats mâles 200 - 250 g

1	37,1	37,3	37,3	37,3	37,3
2	37,3	37,3	37,7	37,4	37,6
3	37	37,2	37,2	37,4	37,4
4	37,5	37,5	37,4	37,3	37,8
5	37,6	37,3	37,3	37,2	37,3
6	37,4	37	37,7	37,7	37,8
7	36,6	36,4	37,3	36,8	37,4
8	37,5	37,7	37,7	37,6	37,5
Moyenne	37,25	37,22	37,45	37,33	37,51

Tableau n° 7 Rats femelles 200 - 250 g

1	37,8	38,3	38,1	38,2	38,2
2	37,7	38,2	37,9	38	37,8
3	38,2	38	38,3	37,9	38
4	37,8	38,3	37,9	38,2	38,1
5	37,3	37,5	37,8	37,4	37,7
6	37,1	37,1	37,2	37,3	37,7
7	36,9	37,8	38	38	38,3
8	37,5	37,7	37,9	37,9	37,9

Tableau n° 8 — Rats femelles 300 - 350 g

1	37,3	37,3	38	38	37,4
2	37,6	38,2	37,6	37,9	37,3
3	37,5	38	38	38,5	38,2
4	36,9	37,6	37,9	37,9	37,9

Tableau n° 9 — Rats mâles 300 - 350 g

1	37,9	37,9	37,5	37,7	37,3
2	37,2	37,7	37,2	37,5	36,5
3	37,3	37,5	37,8	37,4	37,3
4	37,1	37,4	38,2	37,8	37,4

Tableau n° 10 — Rats femelles 350 - 400 g

1	37,9	38,2	38,2	38,2	37,7
2	37,6	37,7	38,2	37,6	37,2
3	36,9	37,4	37,8	37,5	37,4
4	37,2	37,7	38	37,9	37,3

Tableau n° 11 — Rats mâles 350 - 400 g

1	37,5	37,5	37,4	37,7	37,4
2	37,2	37,2	37,7	37	37,2
3	37,4	37,8	38,5	37,8	37,5
4	37,1	37,1	38,3	37	36,9

Calcul moyennes : rats mâles 350 - 400 g
rats femelles 350 - 400 g.

Tableau n° 12 Moyenne/rat femelle

1	37,9	38,2	38,2	38,2	37,7	38,04
2	37,6	37,7	38,2	37,6	37,2	37,66
3	36,9	37,4	37,8	37,5	37,4	37,4
4	37,2	37,7	38	37,9	37,3	37,62
Moyenne/ heure	37,4	37,75	38,05	37,8	37,4	37,68

Tableau n° 13 Rat mâle Moyenne/rat

1	37,5	37,5	37,4	37,7	37,4	37,5
2	37,2	37,2	37,7	37	37,2	37,26
3	37,4	37,8	38,5	37,8	37,5	38,8
4	37,1	37,1	37,3	37	36,9	37,08
Moyenne/ heure	37,3	37,4	37,72	37,37	37,25	37,41

moyenne femelle = 37,68

moyenne mâle = 37,41

Var rat = $\{\Sigma \text{ écarts/ moyenne rats}\}^2$

Var heures = $\{ \Sigma\text{écarts/moyenne heure}\}^2$

Var globale = $\frac{\text{Var rat} + \text{Var heure}}{2}$

Var résiduelle

TABLEAU N°3 ♀ A ♂ B

	Moyenne ± 2s	Var rat	Var heures	Var globale	Var resi-duelli	Moyenne ± 2s	Var rat	Var heure	Var globale	Var resi-duelli
1 150.200g	37.836 ± 0.85	0.174 13	0.026 2	0.179 DL=41	0.193 DL=26	37.455 ± 0.64	0.234 DL=13	0.012 DDL=2	0.104 DL=41	0.047 DL=26
2 200.250g	37.823 ± 0.76	0.235 12	0.024 2	0.147 DL=38	0.112 DL=24	37.269 ± 0.54	0.149 DDL=13	0.053 DDL=2	0.075 DL=41	0.040 DL=26
3 250.300g	37.772 ± 1.06	1.453 4	0.125 4	0.285 DL=24	0.033 DL=16	37.200 ± 0.52	0.151 4	0.068 4	0.073 DL=25	0.055 16
4 300.350g	37.775 ± 0.76	0.162 3	0.211 4	0.141 DL=19	0.112 DL=12	37.48 ± 0.73 DL	0.286 DL=3	0.138 DL=4	0.134 DL=18	0.096 DL=12
5 350.400g	37.68 ± 0.76	0.353 DL=3	0.313 DL=4	0.143 DL=19	0.033 DDL=12	37.41 ± 0.74	0.486 DL=3	0.138 DL=4	0.138 DL=19	0.051 DDL=12
Total Var DL	37.772	0.355 35	0.168 16	0.178 141	0.111 90	37.363	0.219 36	0.094 16	0.099 143	0.053 92

c) Analyse statistique des résultats

Par analyse de variance, nous calculons pour chaque sexe et chaque classe de poids les variations (tableau n°3).

- entre sujets

- entre heures

- globale,

- résiduelle.

Le calcul du paramètre F. de SNEDECOR permet, dans chaque cas, de déterminer la signification en fonction des degrés de liberté des groupes d'une part, et de la résiduelle d'autre part.

Commentaire

1. En général, la variabilité entre sujets est plus large que la variabilité d'un sujet à différentes heures (Comparaison pour chaque groupe de la variance "rat" et "heure").

2. Comparaison entre les sexes

   - entre sujets

     F_{36}^{35} = 1,62 : non significatif.

     La variance des femelles est plus grande que celle des mâles, mais cette différence est non significative, donc il existe une hétérogénicité plus grande chez les femelles.

   - entre heures

     F_{16}^{16} = 1,79, non significatif.

     La variance des femelles dans le temps est plus élevée que celle des mâles, mais cette différence est non significative, donc hétérogénicité et plus grande variabilité des femelles après manipulation.

   - globale

     F_{143}^{141} = 1,79 significatif

L'hétérogénicité et la variabilité des femelles sont plus grandes que celles des mâles.

3. Comparaison des moyennes

L'analyse des variances donne:

	D.L.	Variance	Test de F
entre sexe	1	0,429	$F_4^1 = 42,6$ Non significatif
entre Poids	4	0,008	$F_4^4 = 0,86$ Non significatif
résiduelle	4	0,010	2 s = 0,20
Totale	9		

- Les températures moyennes des fe-elles sont 37,77, celle des mâles 37,36, cet écart est hautement significatif;

- Les variations de poids n'entraînent pas de différences de température (voir chapitre suivant).

4. Evolution de la variabilité des températures rectales entre heures en fonction du poids.

Pour l'ensemble des deux sexes, nous estimons une corrélation entre

Y = Variance des températures et

$X = \frac{\text{Poids} - 125}{50}$ = (rang de la classe de poids, d'étendue 50 g, à partir de 150 g)
125 étant le point médian de la classe de rang 0.

Nous obtenons $Y = \{ 0,055\ X - 0,054\} \pm 0,20$

à $P = 0,93$

avec $r = 0,86$ Pour $N = 10$ Hautement significatif.

La variance des températures rectales entre "heures" augmente avec le poids des sujets, donc plus les sujets sont âgés, plus les écarts de température dûs aux manipulations seront grands.

d) Conclusions

L'étude des variations:

- entre sujets
- dues aux manipulations
- au poids
- au sexe

montre:

que les femelles ont :

. une température rectale plus élevée que les mâles d'environ 0°,40;

. une variance plus grande à trois niveaux:

§ entre sujets: variance 1,62

§ entre heures : variance 1,79

§ globale: variance 1,79

que les manipulations entraînent une variabilité d'autant plus marquée que les sujets sont plus âgés.

Pour ces diverses raisons, nous proposons d'utiliser des rats mâles de 200 à 250 grammes, dont les conditions sont statistiquement les plus favorables.

2° - Variations thermiques dues aux manipulations-

a) But recherché

Nous avons étudié les températures d'une population normale de rats; il convient de connaître les modifications thermiques dues au seul fait de l'injection intra-veineuse. Manipulation stressante, à en voir la réaction vive de défense des animaux lors de l'inoculation.

b) Plan expérimental

- Matériel

18 rats mâles de 200 à 250 grammes.

- Conditions

Les animaux sont séparés dans des cages individuelles.

Les conditions d'expérimentation restent les mêmes que celles exposées dans le chapitre précédent.

- Expérience

. Produit injecté: solvant apyrogène (fourni par l'Institut MERIEUX);

. Volume injecté : 1/2 cm 3

. Voie d'inoculation: intraveineuse, dans la veine du pénis.

Un certain entraînement et une bonne contention sont nécessaires pour le bon déroulement de l'expérience.

Cette méthode nous a paru stressante, les animaux réagissant vivement lors de la piqûre.

. Prise de température: comme dans l'expérience précédente, toutes les heures pendant 6 heures.

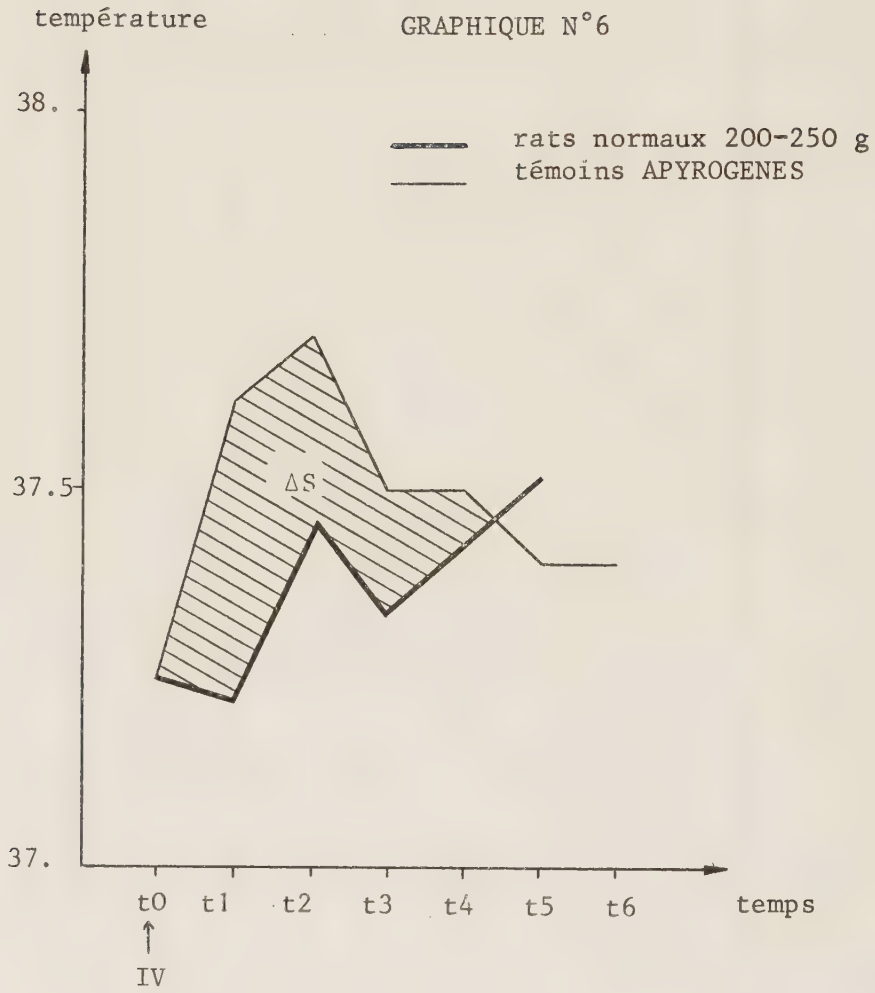
- Résultats

Les résultats sont exposés dans le tableau n° 14.

Tableau n° 14 TEMOINS APYROGENES

n°	t_o	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
1	37,2	37	37	37,2	37,5	37,4	37,2
2	37,8	37,9	38	37,5	37,7	37,5	37,4
3	37,2	37,3	37,9	37,2	37,2	37	36,9
4	36,7	37,5	36,8	37,1	37,5	37,1	37,1
5	37,5	37,5	37,6	37,5	37,9	37,5	37,6
6	37,6	37,7	38,3	38	37,9	38	37,5
7	37,6	38	37,5	37,6	37,9	37,7	37,7
8	38	37,9	37,9	38,1	37,9	38	38
9	36,9	37	37,1	36,9	37,5	37,1	37,3
10	37,4	37,6	38,2	38	37,7	37,7	37,9
11	37,4	37,6	37,7	37,6	37	37,2	37,4
12	36,6	37,1	37,6	37,8	37,6	37,6	36,8
13	37,2	37,2	37,5	37,2	37,2	37,4	37,6
14	36,4	37,6	37,8	37,6	37	37,3	37,6
15	37,4	37,6	37,8	37,4	37,5	37,6	37,4
16	36,5	37,8	38,4	38,3	37,9	37,6	37
17	37,6	38,6	38,4	37,6	37,5	37,6	37,6
18	37,7	38,4	37,9	37,6	37,6	37,4	37,5
Moyenne	37,26	37,62	37,70	37,50	37,50	37,40	37,40

GRAPHIQUE N°6



t0 ⟵ t1 = 1 heure

- Interprétation graphique - Conclusions

Une étude graphique comparée entre les courbes de la température moyenne normale des rats de 200 à 250 grammes (résultats du tableau n° 6) d'une part, et de la température moyenne des rats répondant aux mêmes critères, mais ayant subi une injection intra-veineuse dans la veine du pubis d'autre part, permet de mettre en évidence une surface ΔS non négligeable (graphique n° 6) . Cet accroissement de surface correspond à l'élévation thermique moyenne des rats stressés après l'injection intra-veineuse.

Nous avions noté, lors des simples prises de température, la grande sensibilité des rats à toutes perturbations extérieures ou toutes manipulations trop brutales, celles-ci provoquant à elles seules des écarts thermiques importants.

Il n'est donc pas surprenant que la voie intra-veineuse choisie perturbe la réponse fébrile.

Lors de l'interprétation statistique des résultats obtenus au cours de l'injection de produits pyrogènes, il faudra tenir compte de cette remarque, et calculer un terme correctif, afin que le stress n'interfère pas et ne modifie pas les résultats.

c) Témoins "apyrogènes" anesthésiés

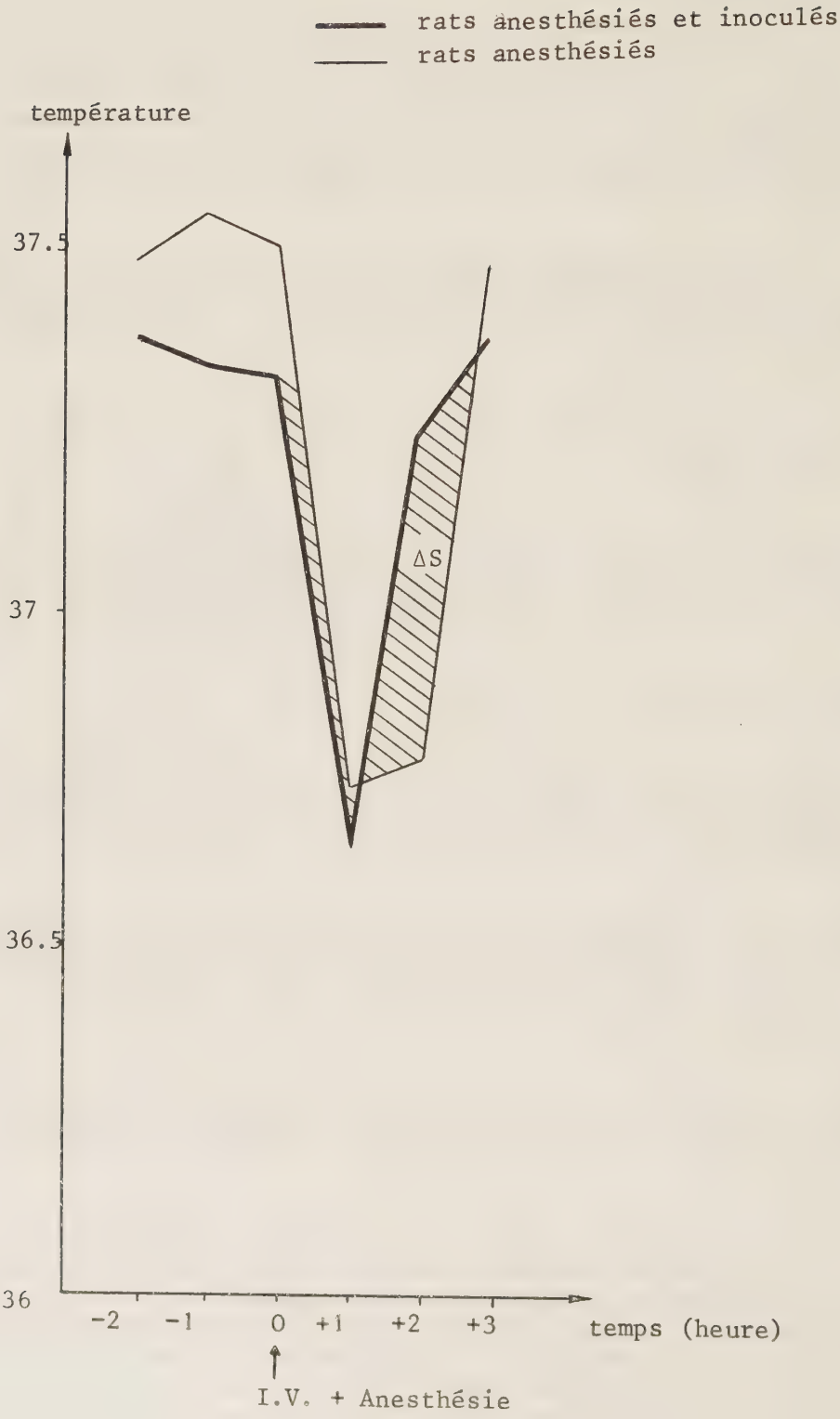
Soucieux d'éviter au maximum toutes sources d'erreur, et dans le but d'éliminer toutes causes de perturbations thermiques autres que l'agent pyrogène lui-même, nous avons, dans une dernière expérience, tenté d'anesthésier des rats avant l'inoculation.

En substituant l'anesthésie au stress, il nous paraissait possible, sinon de neutraliser, du moins d'atténuer les variations individuelles dues aux réactions plus ou moins vives, différentes selon les individus, à l'injection intra-veineuse.

L'anesthésie, même si elle perturbe la régulation thermique, pourrait peut-être modifier la réponse des animaux de façon plus homogène et mieux quantifiable.

Cette idée est sans doute discutable et trop peu approfondie pour être prise en considération . En éliminant le facteur "stress", on introduit une nouvelle inconnue, qui interdit toute généralisation. D'autant que les expériences portaient sur un trop petit nombre d'animaux. Pour cette raison, nous avons hésité à présenter cette expérience dans ce travail. Il nous a cependant semblé dommage de ne point en parler, ne serait-ce que pour servir de base de départ à une étude plus approfondie.

GRAPHIQUE N°7



c) Plan expérimental

- Matériel_ 2 lots de rats mâles de 200 à 250 grammes

  1 lot témoin anesthésié

  1 lot test : anesthésiés et inoculés.

- Conditions : identiques aux expériences précédentes.

- Inoculation : identique aux expériences précédentes.

- Produit injecté : solvant apyrogène

- Dose : 1/2 cm.

  Prises de température : toutes les heures, deux heures avant l'injection, puis 4 heures suivantes.

- Résultats

  Ils sont reportés dans les tableaux n° 15 et 16.

Tableau n° 15 1 - TEMOINS APYROGENES ANESTHESIES ET INOCULES

rats n°	t - 2	- 1	0	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4
1	37,5	37,6	37,3	36,4	37,4	37,5	37,5
2	37,2	37	37,4	36,5	36,7	37,4	37,5
3	37,5	37,5	37,6	36,7	37,7	37,7	37,7
4	37,3	37,3	37	36,7	37,2	37,2	36,9
5	37,3	37,2	37,2	36,9	37	37,2	37,2
Moyenne	37,6	37,2	37,3	36,64	37,22	37,29	37,36

Tableau n° 16 — 2 - TEMOINS APYROGENES ANESTHESIES NON INOCULES

rats n°	t - 2	- 1	0	+ 1	+ 2	+ 3
1	37,6	37,6	37,5	36,5	36,9	37,5
2	37,3	37,6	37,6	36,9	36,6	37,4
3	37,2	37,4	37,2	36,3	37	37,1
4	37,6	37,5	37,6	36,9	37,4	37,6
5	37,7	37,6	37,6	37	36,9	37,7
Moyenne	37,48	37,54	37,50	36,72	36,76	37,46

- Conclusions

Nous nous bornerons à quelques remarques, à l'examen du graphique explicitant les tableaux n° 15 et 16.

. L'hypothermie due vraisemblablement à l'anesthésie est sensiblement la même qu'il s'agisse de rats inoculés ou non.

. La surface ΔS est notablement réduite, et correspond à une diminution de la durée de l'hypothermie chez les rats inoculés.

3° - Contrôle de l'effet pyrogène de différents produits sur rats

a) But recherché

Comparer les réponses à différents produits pyrogènes du lapin et du rat, le lapin servant de référence.

b) Plan expérimental

- Matériel

  Rats mâles de 200 à 250 grammes (ne servant que pour une seule expérience):

  1 lot de trois animaux au minimum par expérience.

- Conditions

  Identiques à celles des expériences précédentes.

- Expérience

  Produits pyrogènes injectés:

  . Etalon O.M.S.: Endotoxine de Shigella sous la forme diluée à 1 mg/ml

  . Etalon interne fourni par l'I.F.I.: Lipopolysaccharide purifié d'Esherichia coli en flacon lyophilisé contenant 600 à 1200 nanogrammes par flacon.

  . Une suspension bactérienne pyrogène de Bordetella pertussis Z. 81 I.

  . Une suspension de virus grippe inactivé purifié: Virions GS - 31.

- Voie d'inoculation : injection intraveineuse dans la veine du pénis.

- Volume injecté: 1/2 cm3

- Prises de température: toutes les demi-heures ou toutes les heures selon les expériences.

c) Résultats

Ils sont exposés dans les tableaux n° 18 - 19 - 20 - 21.

Tableau n° 18

E. COLI

$t_2 - t_1 = 30$ mn

dose	Lapin n°	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5	t_6
5 µg	1	37,2	38	38,2	37,6	38	38,2	38,4
	2	37,4	37,6	38	37,5	37,4	37,7	37,2
	3	36,8	38	37,6	37,8	37,9	37,7	37,7
2,5 µg	1	37,4	37,6	37,6	37,9	37,7	37,3	37,5
	2	37	37,4	36,9	36,8	37,8	37,2	36,8
	3	36,8	37,9	37	37	38,2	38,2	37,4
1 µg	1	37,8	37,6	37,3	37,2	37,8	37,8	37,8
	2	38	38,4	37,9	37,4	37,5	37,9	37,9
	3	38,3	37,8	37	37,3	38	38,2	38
	4	36,2	37,7	37,7	37,8	37,7	37,6	37
	5	37,5	36,5	36,5	36,9	37,1	37,2	36,8
	6	36,4	37,4	37,4	37,3	38,2	38,2	38,1
0,5 µg	1	37	37,9	38,5	38,4	38,4	38	37,4
	2	37,3	37,5	38,4	37,9	37,9	37,6	37,6
	3	36,6	36,8	36,8	37,2	37	37,3	37,6
	4	37,5	37,6	37,8	37,7	36,4	36,4	36,5
	5	36,8	37,6	37,8	37,6	37	37,3	37,6
0,25 µg	1	38,2	38,8	38,5	38	38,2	38,6	38,4
	2	37	38	37,7	37,9	38	37,7	37,7
	3	37,4	38,2	37,6	38	38	37,7	37,6
	4	36,6	37,6	37,6	37,2	37,3	37	37,6
0,1 µg	1	37,5	37,8	39	38,9	38,6	38,4	38
	2	37	38,2	39	38,3	38,1	37,9	37,9
	3	37,3	37,1	37,2	38,2	38,2	37,8	37,8
	4	37,8	38,2	38,4	37,9	37,9	37,6	37,4
	5	36,5	37,9	38,2	36,7	37	36,6	36,9
	6	37,3	37,7	38,1	37,2	38	37,2	36,8
	7	37,2	37,6	38	37,6	37,6	38	38
0,01 µg	1	37,8	38,6	38,8	38,8	38,6	38,3	38,8
	2	37	37,5	37,7	37,7	37,4	37,3	37,6
	3	36,3	37,7	38,4	38,2	37,8	37,3	38

to : 1/2 avant inoc.

t1 = 1/2 après

Tableau n° 19

SHIGELLA

+ 1 - T2 = 30 mn

dose	rat n°	to	t1	t2	t3	t4	t5	t6
2 µg	1	36,2	37,9	36,5	36,5	36,4	36,5	36,5
	2	37	38,3	38,1	37,8	38	37,9	37,3
	3	37,1	39,2	38,6	38,6	38,5	38	37,6
1 µg	1	37,5	37,6	37,4	37,3	37,1	37,2	37
	2	37	37,5	37,7	38	37,5	37,5	37,5
	3	37,4	38,1	38	37,6	37,9	37,6	37,5
	4	37,7	38,2	37,8	37,9	37,5	37,5	37,3
	5	37,6	38,2	38	37,7	38	38,2	37,5
	6	37,3	38	37,2	38	38	38,2	37,5
0,5 µg	1	36,6	37,4	37,5	37,5	37,6	37,5	37,5
	2	36,6	37,1	37	37,1	37,2	37,5	37,3
	3	37,6	38	38,1	37,5	37,3	37	37,6
	4	37,7	37,7	37	36,4	36,5	36,4	36,5
0,25 µg	1	37,5	38 -	38,1	37,7	37,9	37,9	37,9
	2	37,2	37,5	37,6	37,4	37,2	37,8	37,7
	3	37,5	37,8	37,5	37,8	37,9	37,5	37,5

Tableau n° 20

B. PERTUSSIS

n t1 - t2 = 30 mn

		to	t1	t2	t3	t4	t5	t6
1 µg	1	36,5	37,9	37,8	38	38,3	38	38
	2	37,5	38,7	38,7	38,5	38,5	38,5	38
	3	37,2	38,4	38,6	38,7	38,4	38,6	38,2
0,5 µg	1	37,5	37,8	38,3	38,7	38,6	38,8	38
	2	37,4	37,8	38,2	38,7	38,4	38,5	38,8
	3	37,6	38	38,2	38,3	38,6	38,8	38,5
0,1 µg	1	37,7	37,8	38	38	38,4	38,5	38
	2	37,4	38,4	38,5	39	39	39	38
	3	37	37,5	37,7	38	38	37,8	37,4
0,01 µg	1	37,5	37,9	38	38,5	38,4	38	37,9
	2	37	38,2	38,4	38	38,4	38	38
	3	37,2	37,4	37,5	37,7	37,5	37,4	37,5

Tableau n° 21

VIRUS GRIPPE

n = 1 heure

Dose	rat n°	t - 2	t - 1	to	+ 1	+ 2	+ 3	+ 4
1000 CCA	1	37,2	37,3	37,2	37,4	37,8	38	38
	2	37,5	37,3	37,5	38	38,4	37,4	37,9
	3	38	38,1	37,9	38,6	39	38	38,5
500 CCA	1	36,9	37,1	37,1	37,3	37,7	37,7	36,7
	2	37,6	37,8	37,5	38,1	38,4	37,8	37,6
	3	37,5	37,4	37,8	37,9	37,9	37,9	37,7
250 CCA	1	37,8	37,6	37,6	38,5	37,7	37,5	37,6
	2	37,5	37,5	37,4	37,9	38	38,2	37,9
	3	37,2	37,2	37,1	38,3	38,3	38,6	38

d) Interprétation statistique des résultats

1. Etude de la température des rats avant inoculation

Températures au temps t = 0

Expériences dans lesquelles la température n'a été relevée qu'à ce temps

Expériences avec E. Coli

moyenne = 37,15

var = 0,2415

var/n = 0,0060

n = 60

Comparaison avec moyenne STELLMANN : t = 1,550

Expériences Shigella

moyenne = 37,29

var = 0,1959

var/n = 0,0093

n = 21

Comparaison avec moyenne STELLMANN : t = 0,207

Comparaison avec moyenne E. Coli : t = 1,133.

Expériences B. Pertussis

moyenne = 37,27

var = 0,1233

var/n = 0,0077

n = 16

Comparaison avec moyenne de la population normale de rats trouvée précédemment : t = 0,000

Comparaison avec moyenne E. coli : t = 1,026

Comparaison avec moyenne Shigella : t = 0,153

Températures aux temps $t = -2$, $t = -1$, $t = 0$

- Températures relevées sur les rats avant inoculation témoins virus grippe

Expérience Virus GRIPPE

Tableau n° 22

RATS n°	Températures relevées à			TOTAL
	-2	- 1	0	
1	37,2	37,3	37,2	111,70
2	37,5	37,3	37,5	112,30
3	38,0	38,1	37,9	114,00
4	37,2	37,2	37,2	111,60
5	37,8	37,6	37,6	113,00
6	37,5	37,5	37,4	112,40
7	37,2	37,2	37,1	111,50
8	37,2	37,1	37,2	111,50
9	36,9	37,1	37,1	111,10
10	37,6	37,8	37,5	112,90
11	37,5	37,5	37,4	112,40
12	37,4	37,5	37,5	112,40
TOTAL	449,0	449,2	448,6	1.346,80

L'analyse de variance donne:

- variance/temps : var = 0,00777 ddl = 2 $F^2_{22} = 1,00 < 3,44$
- variance/rats : var = 0,22080 ddl = 11 $F^2_{22} = 28,42 > 2,26$
- variance résiduelle : var = 0,00777 ddl = 22

c'est-à-dire une différence:

- non significative entre les temps
- significative entre les rats.

Pour l'ensemble des rats on a donc: avant inoculation:

- moyenne = 37,41
- var = 0,22080
- var/n = 0,0184

comparaison avec:

- moyenne population témoin : t = 1,032
- moyenne E. coli : t = 1,664
- moyenne Shigella : t = 0,721
- moyenne B. Pertussis : t = 0,866

Conclusion

Les calculs précédents montrent qu'avant l'inoculation la température des rats est remarquablement stable, mais que la variabilité individuelle est importante.

2 - Etude de la température des rats après inoculation

L'utilisation de la méthode employée pour le lapin, précédemment décrite, ayant donné des résultats anarchiques en raison de la grande variabilité individuelle et de la trop forte sensibilité au stress, plusieurs méthodes ont été essayées.

- Calcul de la surface en fonction des logarithmes des temps;
- calcul de la surface en fonction du rapport de l'accroissement à la température de base et des logarithmes des temps,
- comparaison de la température moyenne de la population inoculée avec une dose égale à celle de la population témoin.

Elles n'ont toutes donné que des résultats décevants.

En reprenant l'étude des courbes obtenues après l'inoculation, il est alors apparu que seule une partie du tracé était peut-être utilisable.

Si l'on considère, par exemple, certains des résultats obtenus dans les expériences E. coli, on a :

Pour les témoins:

Tableau n° 23

RATS n°	Températures enregistrées pour t =								
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
1	37,7	38,4	37,9	37,6	37,6	37,4	37,5	37,4	37,6
2	37,4	37,6	37,8	37,4	37,5	37,6	37,4	37,4	37,5
3	37,6	38,6	38,4	37,6	37,5	37,6	37,6	37,5	37,6
4	36,5	37,8	38,4	38,3	37,9	37,6	37,0	36,7	36,8
5	36,4	37,6	37,8	37,6	37,0	37,3	37,6	37,4	37,0
6	37,2	37,2	37,5	37,2	37,2	37,4	37,6	37,2	37,5
7	37,4	37,6	37,7	37,6	37,0	37,2	37,4	37,2	37,4
8	36,6	37,1	37,6	37,8	37,6	37,6	36,8	36,9	37,0
9	37,4	37,6	38,2	38	37,7	37,7	37,9	37,6	37,4
MOYENNE =	37,13	37,72	37,92	37,68	37,44	37,49	37,42	37,25	37,31

Pour la dose 5 µg

Tableau n° 24

Rats n°	Températures enregistrées pour t =								
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
1	37,2	38,0	38,2	37,6	38,0	38,2	38,4	38,4	38,3
2	37,4	37,6	38,0	37,5	37,4	37,7	37,2	37,5	37,3
3	36,8	38,0	37,6	37,8	37,9	37,7	37,7	37,6	37,3
MOYENNE =	37,13	37,87	37,93	37,63	37,77	37,87	37,77	37,83	37,63

Pour la dose 2,5 µg

Tableau n° 25

Rats n°	Températures enregistrées pour t =								
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
1	37,4	37,6	37,6	37,9	37,7	37,3	37,5	37,4	37,6
2	37,0	37,4	36,9	36,8	37,8	37,2	36,8	36,5	37,8
3	36,8	37,9	37,0	37,0	38,2	38,2	37,4	37,5	38,5
MOYENNE =	37,07	37,63	37,17	37,23	37,90	37,57	37,23	37,13	37,97

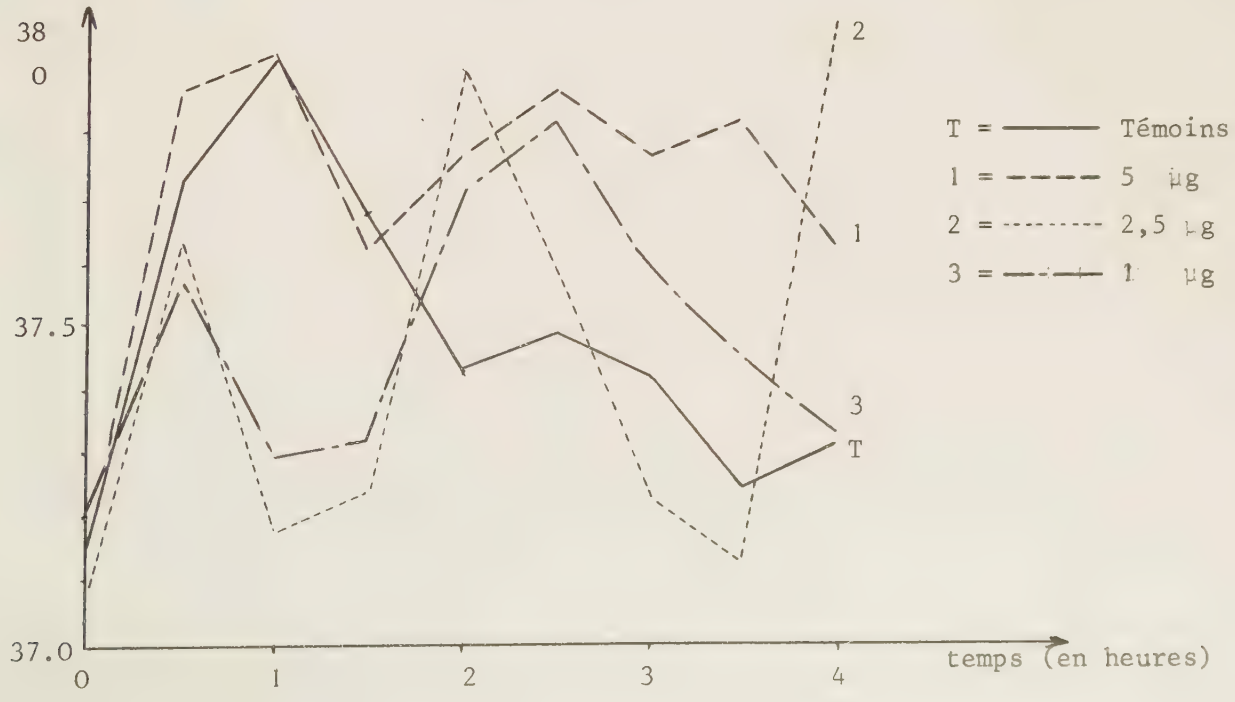
Pour la dose 1 µg

Tableau n° 26

Rats n°	Températures enregistrées pour t =								
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
1	37,8	37,6	37,3	37,2	37,8	37,8	38,1	38,1	37,9
2	38,0	38,4	37,9	37,4	37,5	37,9	37,9	37,9	37,9
3	37,3	37,8	37,0	37,3	38,0	38,2	38,0	38,2	38,5
4	36,2	37,7	37,7	37,8	37,7	37,6	37,0	37,3	36,5
5	37,5	36,5	36,5	36,9	37,1	37,2	36,8	36,5	36,2
6	36,4	37,4	37,4	37,3	38,2	38,2	38,1	36,7	37,0
MOYENNE =	37,20	37,57	37,30	37,32	37,72	37,82	37,60	37,45	37,33

Graphique n° 8 : *Variations des températures moyennes en fonction du temps après inoculation.*

En reportant les températures moyennes ainsi calculées sur un graphique on obtient:



On voit que l'inoculation, quelle qu'elle soit, est suivie d'une élévation rapide de la température, dont les effets se font pratiquement sentir jusqu'à t = 1,5 - 2 heures.

Ces remarques sont à rapprocher de celles faites au chapitre III, où les témoins apyrogènes répondaient au stress d'inoculation par une forte hyperthermie.

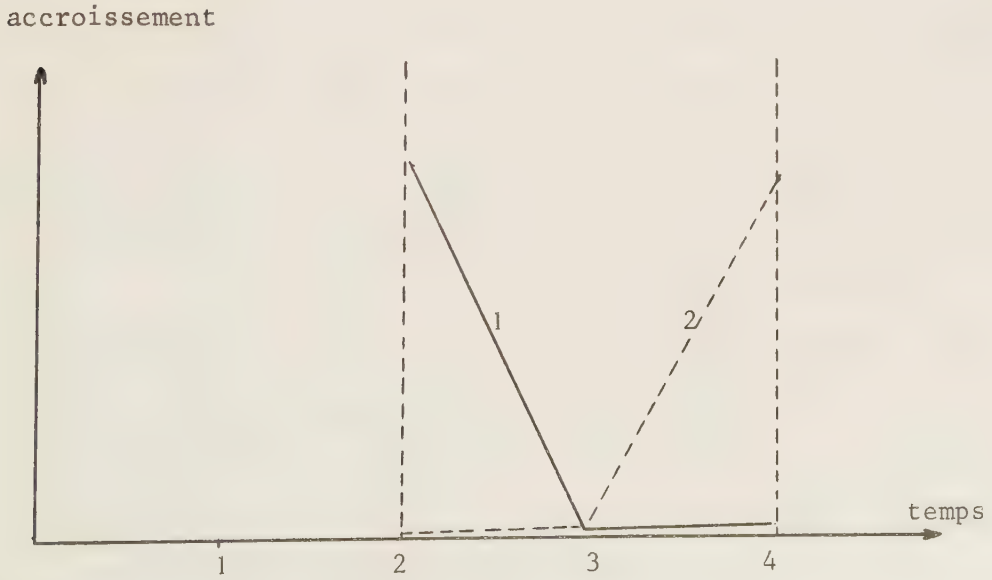
La méthode proposée consiste:

1°) A ne considérer que les températures enregistrées à partir de 2 heures (On pourrait choisir 1,5 heure, mais ce temps ne figure pas dans certaines expériences).

2°) A calculer les surfaces en fonction de log. t au lieu de t.
Cette modification est légitimée par le fait que les doses fortement pyrogènes ont tendance à donner une forte élévation de température dès le temps t = 2 et à décroître ensuite, alors que des doses plus faibles commencent avec des valeurs parfois très basses qui augmentent en fin d'expérience.

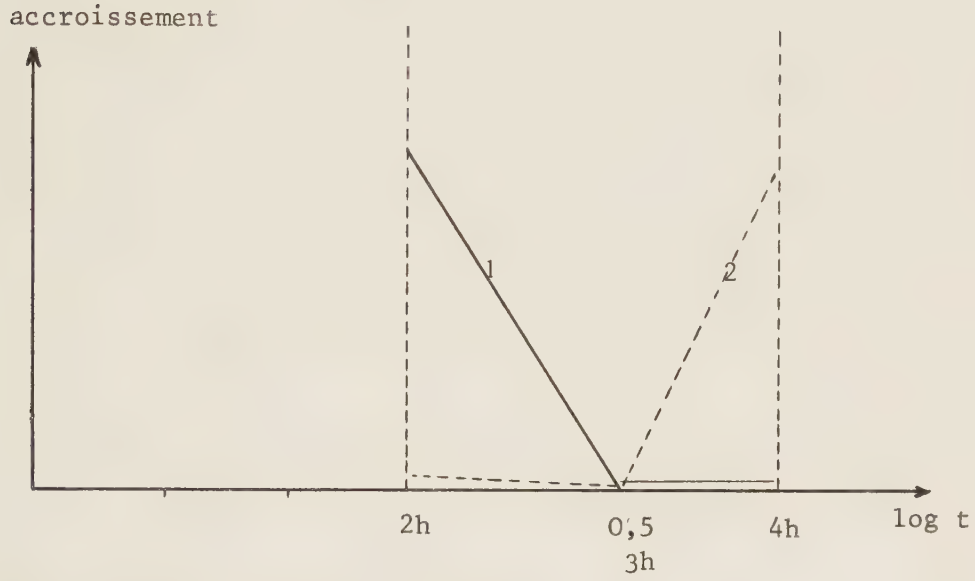
En calculant en fonction de t, on risque d'avoir des surfaces équivalentes pour des courbes fort différentes, alors que cet inconvénient disparaît si l'on fait intervenir log t (voir graphiques 9 et 10).

Graphique 9 : le calcul en fonction du temps donne la même surface pour 1 et 2, alors que les courbes ont des tracés différents.



Graphique 10 : Calcul en fonction de log t

La surface sous la courbe 2 est plus petite que celle de la courbe 1.



En procédant de cette manière, on obtient :

Expériences E. COLI *Expérience 1*

Témoins : S = - 0,067 $\bar{S}$ = - 0,018 var = 0,0021 var/n = 0,0007
0,025
- 0,011
comparaison à 0 : t = 0,682

Dose 5 µg : S = 0,321 $\bar{S}$ = 0,200 var = 0,0263 var/n = 0,0087
0,015
0,263
comparaison avec témoins :
t = 2,250 < 2,776 différence douteuse.

Dose 2,5 µg: S = 0,019 $\bar{S}$ = 0,127 var = 0,0303 var/n = 0,0101
0,034
0,328
comparaison avec témoins:
t = 1,395

Dose 1,0 µg: S = 0,022 $\bar{S}$ = 0,076 var = 0,0252 var/n = 0,0084
- 0,049
0,255
comparaison avec témoins:
t = 0,986

Si, malgré les faibles valeurs de t, on calcule la relation S = f(log D) on a:

$a_1 = 0,174$ $a_o = 0,071$ $r = 0,3455$

var $a_1 = 0,0317$ var = 0,0183 $t_r = 0,974$

$t_{a_1} = 0,977$ ddl = 7

Régression douteuse, en accord avec les résultats précédents.

Expérience E. COLI *Expérience 2*

Témoins : S = 0,222 $\bar{S} = 0,126$ var = 0,0224 var/n = 0,0056
0,276
0,055
- 0,049
comparaison à 0 : t = 1,684

Dose 1 µg : S = 0,335 $\bar{S} = 0,181$ var = 0,1086 var/n = 0,0362
- 0,197
0,406
comparaison avec témoins: t = 0,269

Dose 0,5 µg,: S = 0,207 $\bar{S} = 0,080$ var = 0,0582 var/n = 0,0116
0,056
0,216
- 0,330
0,252
comparaison avec témoins: t = 0,351

Dose 0,35 µg : S=- 0,017 $\bar{S} = 0,045$ var = 0,0086 var/n = 0,0021
0,189
0,140
0,165
comparaison avec témoins: t = 0,080

Dose 0,10 µg : S = 0,078 $\bar{S} = 0,045$ var = 0,0202 var/n = 0,0050
0,099
- 0,063
0,222
comparaison avec témoins: t = 0,787

Pas de relation dose/effet: aucune dose n'est pyrogène.

Expérience E. COLI *Expérience 3*

Témoins : S = 0,181 $\bar{S}$ = 0,135 var = 0,0041 var/n = 0,0020
0,090 comparaison à 0 : t = 3,030 < 12,706

Dose 0,1 µg : S = 0,223 $\bar{S}$ = 0,224 var = 0,0021 var/n = 0,0007
0,271 comparaison avec témoins:
0,179 t = 1,715

Dose 0,01 µg = S = 0,171 $\bar{S}$ = 0,234 var = 0,0175 var/n = 0,0058
0,144 comparaison avec témoins:
0,386 t = 1,121

Pas de relation dose/effet : aucune dose n'est pyrogène.

Les résultats sont homogènes et cohérents. La seule dose pour laquelle on pourrait admettre une certaine pyrogénicité est la plus forte: 5 µg.

Expériences SHigella *Expérience 1*

Témoins : S = - 0,035 $\bar{S}$ = - 0,006 var = 0,0016 var/n = 0,0008
0,032 comparaison à 0 : t = 0,213

Dose 2 µg : S = 0,055 $\bar{S}$ = 0,138 var = 0,0054 var/n = 0,0018
0,163 comparaison avec témoins :
0,197 t = 2,829 < 3,182, différence douteuse.

Dose 1 µg : S = - 0,066 $\bar{S}$ = 0,039 var = 0,0095 var/n = 0,0031
0,055 comparaison avec témoins:
0,128 t = 0,721

Le calcul de la relation : S = f (log D) donne:

a_1 = 0,328 a_o = 0,039 r = 0,5738

var a_1 = 0,0550 var_1 = 0,0050 t_r = 1,397

t_{a_1} = 1,400 ddl = 4

Régression douteuse, en accord avec les résultats précédents.

Expérience SHIGELLA *Expérience 2*

Témoins : S = 0,027 $\bar{S}$ = 0,045 Var = 0,0008 var/n = 0,0002
0,030 comparaison à 0 : t = 3,191 < 6,965
0,079

Dose 1 µg : S = - 0,083 $\bar{S}$ = 0,033 var = 0,0116 var/n = 0,0038
0,131 comparaison avec témoins:
0,052 t = 0,190

Dose 0,50 µg : S = 0,234 $\bar{S}$ = 0,012 var = 0,0624 var/n = 0,0156
0,189 comparaison avec témoins:
- 0,071 t = 0,263
- 0,304

Dose 0,25 µg : S = 0,094 $\bar{S}$ = 0,070 var = 0,027 var/n = 0,0009
0,106 comparaison avec témoins:
0,009 t = 0,755

Pas de relation dose/effet: aucune dose n'est pyrogène.

Ici aussi, les résultats sont homogènes et cohérents. La seule dose qui pourrait être pyrogène est 2 µg.

Expérience B. PERTUSSIS

Témoins: : S = 0,029 $\bar{S}$ = 0,014 var = 0,0106 var/n = 0,0026
- 0,075 comparaison à 0 : t = 0,275
- 0,052
- 0,153

Dose 1 µg : S = 0,460 $\bar{S}$ = 0,347 var = 0,0120 var/n = 0,0040
0,241 comparaison avec témoins:
0,340 t = 4,101 2,571 différence significative

Dose 0,5 µg : S = 0,204 $\bar{S}$ = 0,277 var = 0,0044 var/n = 0,0014
0,334 comparaison avec témoins:
0,293 t = 4,161 > 2,571 différence significative

Dose 0,1 µg : S = 0,136 $\bar{S}$ = 0,211 var = 0,0077 var/n = 0,0025
0,308 comparaison avec témoins:
0,188 t = 2,759 > 2,571 différence significative

Dose 0,01 µg : S = 0,078 $\bar{S}$ = 0,149 var = 0,0216 var/n = 0,0072
0,318 comparaison avec témoins:
0,050 t = 1,365

Le calcul de la relation: S = f (log D) donne:

a_1 = 0,093 a_o = 0,323 r = 0,6256

var a_1 =0,0013 var 1 = 0,0079 t_r = 2,536

t_{a_1} = 2,583 ddl = 10

Régression valable, en accord avec les résultats précédents.

On calcule: log D S L = -3,473 D S L ## 0,0003 µg.

Expérience VIRUS GRIPPE

Témoins : S = 0,051 $\bar{S}$ = 0,059 var = 0,0027 var/n = 0,0009
0,012 comparaison à 0 : t = 1,97 < 4,303
0,115

Dose 1000 CCA : S = 0,213 $\bar{S}$ = 0,147 var = 0,0032 var/n = 0,0010
0,109 comparaison avec témoins:
0,119 t = 2,033 < 2,776 différence douteuse.

Dose 500 CCA : S = 0,138 $\bar{S}$ = 0,115 var = 0,0005 var/n = 0,0001
0,090 comparaison avec témoins:
0,118 t = 1,772

Dose 250 CCA : S = 0,026 $\bar{S}$ = 0,175 var = 0,0386 var/n = 0,0128
0,184 comparaison avec témoins:
0,367 t = 0,991

Le calcul de la régression S = f (log D) donne:

a_1 = - 0,047 a_o = 0,272 r = - 0,1152

var a_1 = 0,232 var 1 =0,0098 t_r = - 0,307

t_{a_1} = 0,307 ddl = 7

Régression pratiquement inexistante, en accord avec les résultats précédents. Pas de relation dose/effet.

C - CONCLUSIONS

La méthode proposée semble donc convenir pour exploiter les résultats sur rats dans la recherche des pyrogènes. Elle donne en tout cas des résultats logiques et cohérents:

- Il n'y a pas de loi dose-effet lorsque la surface moyenne donnée par les animaux inoculés n'est pas différente de la surface moyenne des témoins;
- la loi dose-effet apparaît dans le cas contraire.

Elle met en évidence chez le rat:

- une température relativement stable avant l'inoculation, mais
- une sensibilité au stress très importante, se traduisant par une hyperthermie qui masque l'effet recherché et le dépasse même parfois;
- une très faible sensibilité aux pyrogènes testés.

Pour ces raisons, le rat nous semble difficilement utilisable pour les tests de substances pyrogènes; il n'est en tout cas pas supérieur au lapin.

D I S C U S S I O N

Devant l'échec de notre tentative d'utilisation du rat pour l'essai et le contrôle des substances pyrogènes, nous croyons pouvoir tirer tout de même quelques enseignements positifs de ce travail.

- Le premier tient au fait que tout résultat négatif est en soi un pas en avant dans la connaissance de ses erreurs.

- Le second est la démonstration, à travers les critiques faites au lapin et les difficultés que nous avons eues avec le rat, de l'extrême sensibilité de tout réactif animal; facteurs émotionnels, manipulations difficiles, erreurs d'appréciation sont autant de causes d'erreurs difficiles à éliminer, quels que soient l'animal et l'expérimentateur. Peut-être des expériences effectuées dans de meilleures conditions que les nôtres, avec un matériel mieux adapté, amélioreraient-elles déjà les résultats. Il faut espérer, dans les années à venir, la mise au point de tests in vitro tels que le "Limulus test", beaucoup plus fidèles et reproductibles.

- Enfin, et puisque l'on doit ajourd'hui s'en tenir à des tests in vivo, la "méthode des surfaces", basée sur des principes statistiques simples, présente à nos yeux trois avantages:

  . Elle fait disparaître l'ambiguité de l'interprétation subjective, et facilite les échanges d'information et les vérifications entre laboratoires différents;

  . Les variations anormales de quelques sujets sont pondérées automatiquement par le calcul des surfaces, car elles sont englobées dans l'ensemble des calculs;

  . Le nombre de sujets par observation n'est pas nécessairement constant entre les groupes. De même, les écarts de température entre les groupes ne doivent pas être obligatoirement identiques. Ainsi le plan expérimental se trouve très assoupli, sans entraîner de perte de rigueur statistique. En effet, malgré tous les soins apportés au déroulement d'un protocole biologique, celui-ci est toujours soumis à des aléas difficilement contrôlables, tels que la mortalité intercurrente, l'impossibilité matérielle de respecter les chronologies.

CONCLUSIONS

Après avoir brièvement rappelé les principales propriétés des pyrogènes, et discuté le protocole du "test pyrogène" selon les différentes pharmacopées, nous avons dégagé quelques difficultés relatives à l'application de ces textes officiels.

Deux inconvénients majeurs méritent d'être mentionnés:

- l'un tenant au choix du réactif animal, le lapin, à cause de son équilibre thermique instable, sa sensibilité relative, souvent anormale, son prix de revient non négligeable,

- l'autre lié à l'interprétation même du test: trop rigide, elle ne tient compte que de valeurs brutes et non de variables telles que le temps et la dose. Elle reflète donc mal la totalité de l'activité pyrogénique.

Dans le but de pallier ces difficultés, nous nous sommes proposée dans notre expérience:

- d'interpréter nos résultats par une méthode basée sur l'interprétation statistique de la différence des surfaces définies respectivement par la courbe de température des animaux testés d'une part, et celle des animaux témoins d'autre part. Ce modèle intitulé "Méthode des surfaces" est une méthode quantitative, plus fine, qui rend compte de l'ensemble du phénomène;

- d'utiliser le rat, matériel économique et homogène, pour tester différents produits reconnus pyrogènes chez le lapin. Une trop grande variabilité individuelle, une sensibilité médiocre, et une manipulation difficile ne nous permettent pas de tirer les conclusions espérées.

Si le rat n'est pas supérieur au lapin, et si l'on conserve celui-ci pour les "essais de substances pyrogènes", l'interprétation par la "Méthode des surfaces" diminue les différentes causes d'erreur par sa rigueur mathématique, et représente à nos yeux un réel progrès.

Vu le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon : Pr. FROGET

Vu le Doyen
Vu le Président de l'Université Claude Bernard,
Pour le Président, le Premier Vice-Président de l'Université, Président du Comité de Coordination Médicale : R. TOURAINE

Le Professeur responsable de l'Ecole : Pr. OUDAR

Le Président de la thèse
Pr. BERTOYE

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 4 Juin 1974

B I B L I O G R A P H I E

1 - ATKINS E. -

Pathogenesis of Fever .
Physiol. Rev. - 1960 - 40 - 580.

2 - ATKINS E., BODEL P., and FRANCIS L. -

Release of endogenous pyrogen in vitro from rabbit mononuclear cells.
J. Exp. Med. (1967) - 126 - 357.

3 - ATKINS E., CRONIN M., ISACSON P. -

Endogenous pyrogen release from rabbit blood cells incubated in vitro vith parainfluenza virus.
Science - (Washington) - (1964) - 146 - 1469.

4 - ATKINS E. and HUANG W.C. -

Studies on the pathogenesis of fever with influenzal viruses.
J. exp. med. (1958) - 107 - 383.

5 - ATKINS E. and HUANG W.C. -

J. Exp. Med. (1958) - 107 - 403.

6 - ATKINS E. and WOOD W.B. -

Studies on the pathogenesis of fever.
J. Exp. Med. (1955) - 101 - 519.

7 - ATKINS E. and WOOD W.B. -

J. Exp. Med. (1955)- - 102 - 499.

8 - BANKS H.M. -

Am. J. Clin. Patho. (1934) - 4 - 460.

9 - BEESON P.B. -

J. Exp. Med. (1947) - 86 - 29.

10 - BERANGER G., JOUBERT L. -

Bull. Soc. Sc. Vétér. LYON, 1961 - 63 - 148.

11 - BERANGER G., JOUBERT L. -

Bull. Société sc. Vétér. LYON - 1962 - 64 - 403.

12 - BERANGER G, JOUBERT L. -

Bull. Société Sc. Vétér. LYON, 1963, 65, - 48.

13 - BESWICK M. -

Thèse Pharm. PARIS (1961) - 342.

14 - BILLROTH T. -

Arch. of Klin. chir. (1865) - 6 - 114.

15 - BODEL P. et DILLARD M. -

J. Clin. invest. (1968) - 47 - 107 - 117.

16 - BODEL P. et DILLARD M. -

Ann. Intern. Med. U.S.A. (1968) - 69 - 875-9.

17 - BORISON H.L. - CLARK W.G. -

Advanus in Pharmacology (1965) - 5 - 129.

18 - Bull. org. Mond. Santé (1959) - 20 - 1241-44.

19 - BURDON - SANDERSON J. -

Practitioner 1876 - 16 - 257.

20 - CHARONNAT R., LECHAT P. -

Ann. Pharm. Franç. (1950) - 8 - 161.

21 - CHARONNAT R. , LECHAT P. -

Ann. Pharm. Franç. (1951) - 9 - 22.

22 - COOPER J.F., HOCHSTEIN H.D., SELIGMANN E.B.) -

Bulletin of parenteral drug ass. (1972) - 26 - 153-162.

23 - COOPER J.F., HOCHSTEIN H.D., SELIGMANN E.B. , EIFIN R.J., WOLFF S.M. -

Bull. Parent. drug. ass. (1973) - 27 - n° 3.

24 - CO-TUI (F.W.) et SCHRIFT M.H. -

Proc. soc. exp. biol. med. (1939) - 42 - 549.

25 - CO-TUI F.W. et SCHRIFT M.H. -

Proc. soc. exp. biol. med. (1942) - 27 - 569.

26 - CO-TUI F.W. et SCHRIFT M.H. -

Proc. soc. exp. biol. med. (1942) - 27 - 320.

27 - CO-TUI F.W. et SCHRIFT M.H. -

J. Lab. med. (1944) - 29 - 58.

28 - DARE J.G. -

Pharm. 5 (1953) - 171 - 334.

28 bis - DARE J.G. , NOGEY G.A. -

J. Pharm. Pharmacol. (1954) - 6 - 325.

29 - DAWSON et TODD -

J. Pharm. (London) - (1952) - 421.

30 - DE CLAVIERE M. -

Thèse Doctorat Vétérin. LYON (1973).

31 - DORCHE J. -

Conférence de perfectionnement des Internes en Pharmacie de LYON (1950).

32 - DORCHE J. et BOUTHIER G. -

Ann. Pharm. Franç. (1949) - 7 - 267.

33 - DORCHE J., BOUTHIER G., ADRIET M.T., CASTAING M. -

Ann. Pharm. Franç. (1950 - 8 - 358.

34 - EICHENBERGER E. - (1966)

- Handbuch der experimentellen Pharmakologie (vol. 16)
- Kohlenhydratstoff Wechsel, Fiebier.
P. 215 - 378 (SPRINGER Verlag. 1966).

35 - EICHENBERGER E. SCHIMIDHAUSER-KOPP M., HURNI H., FRICSAY M., WESTPHAL P. -

Schweiz. Med. Wschr. (1955) - 85 - 1190.

36 - FUKUDA T. -

Jap. J. Physiol. (1963) - 13 - 240.

37 - GERMAN A. -

Ann. Pharm. Franç. (1948) - 6 - 464.

38 - GIROUX J., RIPOLL J., CHARLES M. -

Soc. pharm. Montpellier, 20 février 1950.

39 - GUIBAUD S. -

Thèse Pharm. LYON (1967).

40 - GREE G. -

Thèse Med. Vétér. LYON (1964) - 42.

41 - GREISMAN S.E., HORNICK R.B. -

Proc. Soc. exp. Biol. med. (1969) - 131,- 1154.

42 - HACKENBERG -

Arch. exper. path. et Pharmack (1948) - 21 - 240.

43 - HALL C.H. et ATKINS E. -

J. exp. Med. (1959) - 109 - 339.

44 - HARDY J.O. -

Ann. de biol. clin. (1949 - 7 - 189.

45 - HARDY J.O. -

W.B. Saunders Company (1965).

46 - HASKINS W.T., LANDY M., MILMER K., RIBI E. -

J. exp. med. (1961) - 114 - 665-684.

47 - HERBOTT J. et KLAUEHN -

Farbxerken . Hoechst - AG (ex Meister Lucius et Brüning) Francfort - Arzheim - Forch (Drug - res) (1971) - 21 - 553.

48 - HORT E.C. et PENFOLD W.J. -

Brit. med. Journ. (1859) - 11 - 1589.

49 - HORT E.C. et PENFOLD W.J. -

Proc. Roy. Soc. (1912) - 5 - 131.

50 - HRIBALOVA-SHUH (1967) -

51 - JAHONOVSKY J. -

Nature (1959) - 183 - 693.

52 - JONA J.L. -

J. Hyg. (1915) - 15 - 169.

53 - KEENE W.R. , SILBERMAN H.R., LANDY M., STRLECKY -

J. Clin. invest. (1961) - 40 - 295 - 30.

54 - KEIDERLING, WÖHLER et WESTPHAL -

Arch. exp. Path. et Pharmacol. 1953 - 217-293.

55 - KESSLER -

Pharmac. Acta - Welvetioe 1955 - 30 - 93.

56 - KIM Y.B. et WATSON D.W. -

J. exp. med. (1970) - 131, - 611.

57 - LECHAT P. -

Ann. Pharm. Franç. 1964, 22 - 105.

58-LECHAT P. -

G.%. de France (1971) - 78 (n° 22).

59 - LECHAT P., Mme SZFRANOWA H., Mme GARDEY C., LE VASSOR et G. OLIVE -

Ann. Pharm. Franç., 1969 - 27 .

60 - LEE R.C. -

Amer. J. Physiol. (1939) - 125 - 521.

61 - LEVIN J. et BANG F.B. -

Bull. John Hopkins Hosp. 1964 - 115 - 265.

62 - LEVIN J. et BANG F.B. -

Thrombos - Diathis - Haemorrh - 19 - 186.

63 - MARCUS S., ANSELMO C et LUKE -

J. Amer. Pharm. ass. sc. edit. - 1960 - 49 - 616-619.

64 - MORGAN H.R. -

J. immunol. (1941) - 41 - 161 -180.

65 - MOSES J.M., ATKINS E. -

J. exp. med. 1961 - 114 - 939.

66 - MOTT P.D. et WOLFF S.M. -

J. clin. invest. (1966) - 45 - 372.

67 - NEYTSCHEFF N. -

Zbl bakt (1963) - 190 - 132.

68 - PARDON P. -

Thèse Vétér. ALFORT (1970).

69 - PETERSDORF R.G. et BENNETT (I.L.)

J. exp. med. (1957) - 106 - 293.

70 - PHILIPPE J. -

Les méthodes statistiques en Pharmacie et chimie.
Editions MASSON - PARIS 1967, page 187, 183 et 176.

71 - RENOUX M. et MARCELLI D. -

La revue du praticien , 22 , n° 15, 1422.

72 - ROOT R.K. et WOLFF -

J. exp. med. (1968), 35 - 81 - 91.

73 - SCHAEDLER R.W. , DUBOS R.J. -

J. exp. med. (1961) - 113-559.

74 - SEIBERT F.B. -

Amer. J. Physiol. (1923) - 67 - 90.

75 - SEIBERT F.B. -

Amer. J. Physiol. (1925) - 71 - 621.

76 - SHEAGREEN -

Nature (London) (1966) - 210 -

77 - SCHAEDLER R.W., DUBOS R.J. -

J. exp. med. 1961 - 113 - 559.

78 - SIMON S., TOTH G., WALLERSTEIN G.Y. -

Gyogyszereszet (1972) - 16 - 6 - 206-211.

79 - SMITH P.K. et HAMBOURGER W.E. -

J. Pharmacol. exptl therap. (1935) - 54 - 346 - 351.

80 - STELLMANN C. BERANGER -

La comparaison des cinétiques biologiques par le test des surfaces sous la courbe. 1973 - Résultats non publiés.

81 - TAL C. et OLITZKI L. -

J. immunol. 1948 - 58 - 337-348.

82- TENNENT D.M. et OTT W.H. -

Analyst (1952) - 77 - 643 - 652.

83 - VALYI - NAGY et KALENTEY -

Pharmazie, BERLIN (1959) - 14 - 295.

84 - WAGNER - BONNET et LEQUIRE

J. exp. med (1949) - 90 - 321.

85 - WECHSELMANN W. -

Deut. med. Wschr (1911) - 37 - 779.

86 - WESTPHAL O. -

Polysaccharides in Biology (G.F. Springer ed.) trans. 2ème Conf. N.Y. Josi ah Macy Jr Foundation (1956),p.115.

87 - WHITTET T.D. -

J. Pharm. Pharmacol. (1956) - 8 - 1034.

88 - WINTER C.A. et NUSS G.W. -

Toxicology and applied pharmacology (1963) - 5 - 247-256.

89 - WORK E.L. -

Pyrogens and Fever - Ciba Foundation . Symposium edit. by wolstenholme and Birch Londres (1971) - Churchill et Livingstone edit.

90 - WYLIE D.W. et TODD J.P. -

J. Pharm. Pharmacol. (1948) - 21 - 240-252.

91 - WYLIE D.W. et TODD J.P. -

J. Pharm. Pharmacol. (1949) - I - 818-835.

92 - ZELLER et OETTEL -

Pharm. Ind. (1965) - 27 - 763.

Association Corporative des Etudiants en Médecine de Lyon
8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 2 - Tél. (78) 74-33-47